

Національний фармацевтичний університет  
Міністерство охорони здоров'я України

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького  
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Умінська Катерина Анатоліївна**

УДК 615.12:615.454.1:615.072:615.322

## **ДИСЕРТАЦІЯ**

**Розробка методик для контролю якості та визначення стабільності  
комбінованих екстемпоральних мазей з компонентами рослинного  
походження**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

К. А. Умінська

Науковий керівник Савченко Леся Петрівна, кандидат  
фармацевтичних наук, доцент

Харків – 2018

## АНОТАЦІЯ

*Умінська К. А.* Розробка методик для контролю якості та визначення стабільності комбінованих екстемпоральних мазей з компонентами рослинного походження. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 «Фармацевтична хімія та фармакогнозія». – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2018, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, Львів, 2018.

Дисертація присвячена розробці методик для вивчення стабільності мазей аптечного виготовлення з рослинними компонентами. Як об'єкти дослідження обрані мазі з спиртовими настоянками календули та евкалипту, а також мазь Симановського, які готуються про запас в аптеках України. В процесі дослідження розроблені методики ідентифікації та кількісного визначення компонентів досліджуваних мазей, доведена можливість їх використання для оцінки стабільності ЛФ. Проведений контроль якості мазей за основними показниками якості: опис, кількісне визначення, мікробіологічна чистота та відповідність реологічним параметрам.

Оскільки основними компонентами мазей з настоянками є комплекс біологічно активних речовин, які зумовлюють їх фармакологічну дію, в процесі контролю якості таких лікарських форм (ЛФ) було вирішено використати методи газової хроматографії (ГХ) (з мас- та полуменево-іонізаційним детектором, методом парофазного аналізу), що дозволяють їх одночасно вибірково визначити.

Для вивчення стабільності та контролю якості мазі з настоянкою евкалипту запропонований метод ГХ з мас-детектором (ГХ-МС). В процесі аналізу ідентифіковано десять сполук рослинного походження. Вони можуть бути використані як маркери в оцінці стабільності мазі в процесі зберігання за зміною величини площі піка рослинних компонентів.

Для вивчення стабільності мазі з настояюкою евкالیпту в процесі зберігання була розроблена методика кількісного визначення 1,8-цинеолу методом ГХ з полуменево-іонізаційним детектором (ГХ-ПІД). Дослідження проводились на газовому хроматографі GC-2010 Plus Shimadzu з колонкою Rxi-5MS (30,0 м×0,25 мм×0,25 μм). В процесі дослідження визначені основні параметри придатності системи: число теоретичних тарілок 548885, коефіцієнт симетрії піка 1.15 та фактор утримування 5.59. Для основних параметрів кількісного визначення (час утримування, площа і висота піку, концентрація компоненту) було розраховане значення збіжності відгуку, яке не перевищує допустимий критерій ( $S_r$ ,  $\%_{max}=1.30<2.75$ ). Проведена валідація розробленої методики за вимогами статті 5.3.N.2 “Валідація аналітичних методик і випробувань”. Всі параметри лінійності ( $b=0.99$ ;  $a=1.27\leq 5.12$ ;  $S_0=1.71\leq 1.77$ ;  $r=0.9999\geq 0.9916$ ), правильності ( $\delta=0.94\leq 1.02$ ) та прецизійності ( $\Delta_Z=0.72\leq 1.02$ ) відповідають встановленим критеріям, що свідчить про можливість використання методики в аналізі. Розробленим методом визначено кількісний вміст 1,8-цинеолу в настояці евкالیпту та в мазі з її вмістом. Отримані результати свідчать про відповідність кількісного вмісту 1,8-цинеолу в мазі його вмісту в настояці. Час утримування 1,8-цинеолу склав 13.14 хв. В результаті чотирьох послідовних аналізів хлороформного розчину мазі визначений параметр збіжності отриманих результатів ( $RSD$ ,  $\%=0.68\leq 1.92$ ), який відповідає вимогам. Також розраховані параметри придатності системи та інші хроматографічні характеристики, які свідчать про можливість використання методики для оцінки стабільності мазі з настояюкою евкالیпту за визначенням кількісного вмісту 1,8-цинеолу.

Вивчення структурно-механічних властивостей мазі з настояюкою евкالیпту проводили протягом місяця. Наявність петлі гістерезису на реограмі плинну мазі свідчить про наявність тиксотропних властивостей. Невисокі показники структурної в'язкості мазі, відповідні величини коефіцієнтів динамічного розрідження та значення механічної стабільності (1.44) гарантують гарні споживчі властивості мазі та однорідний розподіл її компонентів в основі при виготовленні. Для оцінки ступеня збереження реологічних параметрів проведено їх визначення

протягом місяця (на 10-й, 20-й та 30-й день зберігання мазі за температури  $5\pm 3$  °C). Отримані значення структурної в'язкості, механічної стабільності, коефіцієнтів динамічного розрідження незначно відрізняються один від одного, що підтверджує стабільність реологічних параметрів мазі в процесі зберігання.

Розроблена методика ГХ методом парофазного аналізу (ГХ-ПФА) мазі з настойкою календули та евкаліпту на газовому хроматографі GCMS-QP2010 Ultra Shimadzu з колонкою Rxi-5MS (30,0 м×0,25 мм×0,25 μм). В результаті аналізу обрано оптимальний розчинник для мазі, яким виявився хлороформ. В процесі аналізу виділено три сполуки-маркери: α-пінен (47.84 %;  $t_R=8.68$  хв); 1,8-цинеол (40.85 %;  $t_R=12.16$  хв) та β-пінен (11.30 %;  $t_R=10.21$  хв).

Розроблена методика дослідження стабільності мазі з настойками методом ГХ-МС на газовому хроматографі GCMS-QP2010 Ultra Shimadzu з колонкою Rxi-5MS (30,0 м×0,25 мм×0,25 μм). Перед проведенням аналізу розчину мазі визначені рослинні компоненти обох настоек. В настойці календули виділено шістнадцять біологічно активних речовин, а в настойці евкаліпту – дев'ятнадцять. Аналіз хлороформного розчину мазі дозволив ідентифікувати дев'ять речовин-маркерів рослинного походження: 1,8-цинеол, аромандендрен, (-)-глобулол, β-еудесмол, α-еудесмол, криптомеридіол, α-кадінол, 9-епі-(E)-каріофілен та вірідіфлорол. Аналіз мазі через 18 днів зберігання за температури  $5\pm 3$  °C показав зменшення концентрації досліджуваних компонентів. Одним із компонентів даної мазі є димексид. Даний метод також дозволяє визначити його концентрацію в мазі (час утримування ДМСО склав 6.22 хв).

Дослідження мікробіологічної чистоти мазі з настойкою евкаліпту проводили методом двошарового висівання, а мазі з обома настойками – методами глибинного та двошарового висівання протягом місяця. Мазі зберігались за температури  $5\pm 3$  °C. В обох випадках проведено визначення придатності методики для аналізу за вимогами ДФУ. В обох зразках мазей відсутні бактерії *St. aureus* та *Ps. aeruginosa*. Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів склало 20 КУО/г (в мазі з настойкою евкаліпту) та до 10 КУО/г (в мазі з обома настойками), а загальне число життєздатних дріжджових та плісневих грибів – до

10 КУО/г в обох мазах. Отримані результати свідчать про збереження мікробіологічної чистоти мазі протягом місяця.

В процесі вибору та розробки методик кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) мазі Симановського для дослідження її стабільності обрані оптимальні розчинники, які б дозволили провести повне вилучення компонентів з маzewої основи. Для всіх АФІ мазі (фенілефрину гідрохлориду, цинку оксиду та ментолу) обрані оптимальні реакції ідентифікації.

Розроблена та валідована методика кількісного визначення ментолу в мазі методом ГХ-ПІД. Для аналізу обрана початкова температура 50 °С, через перехідну температуру 60 °С до 310 °С, що забезпечило належне відділення ментолу від інших компонентів мазі. Час утримування ментолу склав 8.00 хв. Розраховані параметри придатності системи відповідають вимогам статті 2.2.46 “Методи хроматографічного розділення” ДФУ.

Розраховані валідаційні параметри методики відповідають вимогам. Загальна невизначеність результатів аналізу не перевищує допустимий критерій ( $\Delta_{As,r}=1.61 \leq \max \Delta_{As}=3.20 \%$ ). Дослідження лінійності проводили в концентраційному діапазоні від  $7.812 \times 10^{-7}$  до  $2 \times 10^{-4}$  г/мл ментолу. Розраховані параметри лінійної залежності відповідають чинним вимогам. Визначені МВ та МКВ ментолу:  $2.51 \times 10^{-7}$  г/мл та  $7.58 \times 10^{-7}$  г/мл відповідно, які свідчать про достатню чутливість методики. Величина систематичної похибки є незначущою ( $\delta, \%=0.87 < 1.02$ ), як і значення одnobічного довірчого інтервалу ( $\Delta_Z=0.38 \leq 3.20 \%$ ). Оцінка збіжності результатів після проведення семи паралельних аналізів свідчить про відповідність вимогам ДФУ ( $RSD, \%=1.08 < 3.08$ ). Досліджена специфічність методики – на місці виходу ментолу не спостерігалось жодних піків. Результати кількісного визначення вмісту ментолу в мазі відповідають вимогам статті “М’які лікарські засоби, виготовлені в аптеках” ДФУ (середнє значення кількісного вмісту ментолу в мазі склало 0.0398 г, що складає 99.50 %).

Для проведення кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду обраний метод абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області за довжини хвилі 273 нм.

Було перевірено підпорядкування світлопоглинання досліджуваного розчину закону Бугера-Ламберта-Бера. За вимогами статті 5.3.N.1. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту<sup>N</sup> ДФУ проведене визначення метрологічних характеристик середнього результату питомого показника поглинання ( $A_{1cm}^{1\%} = 92$ ), які відповідають встановленим вимогам. Проведена верифікація методики за показниками специфічність, лінійність, правильність та прецизійність. Встановлено, що розчин плацебо не вносить значимого впливу в сумарне поглинання досліджуваного розчину ( $\delta_{noise}, \%=0.47 \leq 1.02$ ). Виконуються вимоги до параметрів лінійної залежності: вільного члену лінійної залежності ( $a=2.31 \leq 2,32$  та  $5,12$ ), залишкового стандартного відхилення ( $S_0=0.47 \leq 1.69$ ) та коефіцієнту кореляції ( $r=0.9994 \geq 0.9924$ ). Відповідають вимогам ДФУ параметри правильності ( $\delta = 0.20 \leq 1.02$ ) та прецизійності ( $\Delta_Z=0.39 \leq 3.20$ ). Вміст фенілефрину гідрохлориду в мазі визначали двома методами: методом стандарту та питомого показника поглинання. Розраховані метрологічні характеристики свідчать про можливість використання обох способів розрахунку.

Для кількісного визначення цинку оксиду в мазі використаний метод комплексонометрії. Оскільки обрана менша наважка мазі для аналізу була проведена верифікація методики. Всі валідаційні параметри відповідають вимогам. Середній вміст цинку оксиду в мазі склав 99.17 % від номінального, що повністю відповідає вимогам ДФУ за кількісним вмістом. Низьке значення відносного стандартного відхилення ( $RSD, \%=0.65$ ) свідчить про належну відтворюваність результатів аналізу.

Проведено визначення мікробіологічної чистоти мазі методом двошарового висівання протягом місяця (мазь зберігалась за температури  $5 \pm 3$  °C). Отримані результати свідчать про відсутність в зразках бактерій *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*. В зразках мазі кількість бактерій не перевищує 10 КУО/г, як і кількість грибів. Такими чином, мазь відповідає вимогам ДФУ за параметром “Мікробіологічна чистота”.

Здійснена оцінка зміни структурно-механічних властивостей мазі протягом місяця. Мазь характеризується досить високим значенням граничної напруги

зсуву (99,27 Па) та площі гістерезису (66002,46 Па/с), що обумовлено основою мазі. Отримана реограма підтверджує, що мазь має пластично-в'язкі та тиксотропні властивості. Протягом місяця значення структурної в'язкості мазі практично не змінюється, як і значення інших реологічних параметрів, що свідчить про збереження її реологічних властивостей.

З використанням розроблених та верифікованих методик ідентифікації і кількісного визначення була оцінена фізико-хімічна стабільність мазі протягом місяця. Отримані результати свідчать про збереження стабільності мазі за параметрами опис, ідентифікація та кількісне визначення протягом всього терміну досліджень при зберіганні мазі за температури  $5 \pm 3$  °С.

Результати проведених досліджень можуть бути використані для оцінки якості мазей аптечного виготовлення в умовах аптек та лабораторій з контролю якості та продовження терміну їх зберігання. Більшість досліджень, описаних в дисертаційній роботі проведені вперше (вибір та розробка методик для вивчення стабільності мазей з настоянками календули та евкаліпту, мазі Симановського).

Результати досліджень впроваджені в практику роботи Державних служб з лікарських засобів та контролю за наркотиками різних областей України, науково-дослідну роботу ВНЗ України, а також виробничих аптек в Ужгороді та Харкові. Новизна досліджень підтверджена отриманим патентом України на корисну модель.

*Ключові слова:* екстемпоральна рецептура, мазі, контроль якості, настоянка календули, настоянка евкаліпту, ментол.

#### *Список публікацій здобувача*

1. Оцінка мікробіологічної стабільності екстемпоральної мазі для назального застосування / К. А. Умінська, О. П. Стрілець, Л. П. Савченко, В. А. Георгіянц. *Зб. наук. праць співробіт. НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2015. Вип. 24, кн. 5. С. 366-370 (Особистий внесок – брала участь в узагальненні і обробці результатів та підготовці статті).

2. Савченко Л. П., Умінська К. А., Георгіянець В. А. Використання методу Headspace для експрес-аналізу екстемпоральної мазі з настоянками календули та евкаліпту. *Зб. наук. праць співробіт. НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2017. Вип. 28. С. 115-122 (Особистий внесок – брала участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні і обробці результатів та підготовці статті).
3. Development and validation of a gas chromatographic method for the menthol assay in compounding ointment / L. P. Savchenko, L. Ivanauskas, K. A. Uminska, Z. Barsteigiene, V. A. Georgiyants. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. Vol. 10 (3). P. 450-453 (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
4. Identification of Calendula and Eucalyptus alcoholic tinctures volatile compounds in the compounding ointment by Gas chromatography-mass spectrometry. Lesia P. Savchenko, Liudas Ivanauskas, Kateryna A. Uminska, Victoriya A. Georgiyants. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2018. Vol. 12 (1), Suppl. Issue. P. 145-150 (Особистий внесок – брала участь в узагальненні і обробці результатів та підготовці статті).
5. Selection and verification of the method for phenylephrine hydrochloride assay in Simanovsky ointment / L. Savchenko, K. Uminska, N. Bevz, V. Georgiyants. *Scientific Journal «Science Rise: Pharmaceutical Science»*. 2018. Vol. 1 (11). P. 26-31 (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, узагальненні і обробці результатів та підготовці статті).
6. Savchenko L. P., Uminska K. A., Georgiyants V. A. Verification of the zinc oxide assay method in Simanovsky ointment for its chemical stability estimation. *International Journal For Research In Biology & Pharmacy*. 2018. Vol. 4, Is. 3. P. 23-31 (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, узагальненні і обробці результатів та підготовці статті).
7. Спосіб кількісного визначення ментолу в складі комбінованої екстемпоральної мазі методом газової хроматографії / Л. П. Савченко, К. А.



- Умінська, Л. Іванаускас, В. А. Георгіянц: пат. 126228 на корисну модель України: МПК G01N 30/00, A61K 31/01, A61K 9/06. № u 2018 00041; заявл. 02.01.2018; опубл. 11.06.2018, Бюл. № 11 (Особистий внесок – брала участь в патентному пошуку, проведенні експериментальних досліджень та оформленні патенту).
8. Савченко Л. П., Умінська К.А., Георгіянц В. А. Контроль якості мазі Симановського аптечного виготовлення. К., 2018. Вип. 6. 6 с. (Рішення ЕПК “Фармація” Протокол № 103 від 25.10.2017 р.) (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, узагальненні і обробці результатів та оформленні листа).
  9. Порівняння фармакопейних підходів до контролю якості мазей аптечного виготовлення / Л. П. Савченко, В. А. Георгіянц, К. А. Умінська, В. О. Вракін. *Управління якістю в фармації*: мат. VI науково-практичної конференції з міжнародною участю, Харків, 17 квітня 2013 р. Харків, Вид-во НФаУ, 2013. С. 114.
  10. Сучасні підходи до контролю якості м'яких лікарських форм аптечного виготовлення / Л. П. Савченко, К. А. Умінська, В. О. Вракін, В. А. Георгіянц. *Аналітична хімія у фармації*: мат. міжнародної науково-практичної конференції, Харків, 19-20 березня 2015 р. Харків, 2015. С. 73-75.
  11. Контроль мікробіологічної чистоти мазей аптечного виготовлення як гарантія їх безпеки та якості / Л. П. Савченко, К. А. Умінська, В. О. Вракін, В. А. Георгіянц, О. П. Стрілець *Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку*: мат. I науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю, Харків, 24-25 березня 2016 р. Харків, 2016. С. 169-170.
  12. Екстемпоральні мазі: аналіз якості за сучасними вимогами / Л. П. Савченко, К. А. Умінська, В. О. Вракін, В. А. Георгіянц. *Фармація XXI століття: тенденції та перспективи*: мат. VIII Національного з'їзду фармацевтів України, Харків, 13-16 вересня 2016 р. У 2 т., Т. 1., Харків, Вид-во НФаУ, 2016. С. 210.

13. Stability studies of compounding ointment with herbal tinctures / L. P. Savchenko, K. A. Uminska, V. A. Georgiyants, L. Ivanauskas. *“Science and practice 2016”*: the 7<sup>th</sup> International Pharmaceutical Conference, Kaunas, Lithuania, 20-21 October, 2016. Kaunas, 2016. P. 43-44.
14. Савченко Л. П., Умінська К. А., Георгіянц В. А. Розробка методики кількісного визначення ментолу в екстемпоральній мазі. *Управління якістю в фармації*: мат. XI науково-практичної конференції, Харків, 19 травня 2017 р. Харків, Вид-во НФаУ, 2017. С. 153.
15. Савченко Л. П., Уминская Е. А., Георгиянц В. А. Headspace анализ в исследовании экстемпоральной мази с растительными настояками. *Медичні науки: напрямки та тенденції розвитку в Україні та світі*: мат. міжнародної науково-практичної конференції, Одеса, 16-17 червня 2017 р. Одеса, ГО “Південна фундація медицини”, 2017. С. 20-21.
16. Studying of the compounding ointment with Eucalyptus tincture rheological parameters / L. P. Savchenko, K. A. Uminska, G. P. Kukhtenko, V. A. Georgiyants. *Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice: the 8<sup>th</sup> International Conference*, Kaunas, Lithuania, 15 December, 2017. Kaunas, 2017. P. 28-29.
17. Использование метода газовой хроматографии с масс-детектором для изучения стабильности экстемпоральных мазей / Л. П. Савченко, Е. А. Уминская, В. А. Георгиянц, Л. Иванаускас, Н. Б. Саидов. *Наука и инновация*. 2017. № 3. С. 36-38.
18. Development and validation of the GC method for the chemical stability estimation of the compounding ointment with Eucalyptus tincture / V. Georgiyants, L. Savchenko, K. Uminska, L. Ivanauskas. *ChemCYS 2018: Chemistry Conference for Young Scientists*, Blankenberge, Belgium, 21-23 February 2018. Blankenberge, 2018. P. 63.
19. Умінська К. А., Савченко Л. П., Георгіянц В. А. Дослідження хімічної стабільності мазі Симановського. *Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій*: тези доповідей Всеукр. наук.-практ. конф. з

міжнар. участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича, Харків, 12-13 квітня 2018. Харків, НФаУ, 2018. С. 351.

### ANNOTATION

*Uminska K. A.* Development of methods for quality control and stability determination of combined extemporal ointments with plant origin components. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

The thesis for a candidate in pharmaceutical science degree in speciality 15.00.02 «Pharmaceutical chemistry and pharmacognosy». – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2018, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Lviv, 2018.

The dissertation is devoted to the methods development for the stability estimation of compounding ointments with plant components. Ointments with Calendula and Eucalyptus alcoholic tinctures and Simanovsky ointment, which are being prepared for stock in pharmacies of Ukraine, were chosen as objects of the study. During the research, methods of identification and quantitative determination of components of the studied ointments have been developed. Possibility of their using in dosage forms stability studies has been proven. The ointments analysis on the main quality indicators was performed during the study: description, assay, microbiological purity and compliance with rheological parameters.

The main components of ointments with tinctures are complex of biological active substances. They determine their pharmacological action. So in the process of dosage forms analysis methods of gas chromatography (with a flame-ionization detector, mass detector and headspace analysis) was decided to use. They allow selectively determine them at the same time.

For the quality control of ointment with the Eucalyptus tincture the gas chromatography method with a mass detector has been proposed. During the ointment

analysis ten herbal compounds was identified. They can be used as markers in the ointment stability analysis during its storage by assessment changing their peak area.

The GC method for 1,8-cineole quantitative determination was developed for the ointment with Eucalyptus tincture stability analysis during its storage. The studies were performed on the GC-2010 Plus Shimadzu gas chromatograph with the Rxi-5MS column (30.0 m×0.25 mm×0.25 μm). In the process of analysis, the main parameters of the system suitability were determined: plate number 548885, symmetry factor 1.15 and retention factor 5.59. For the main parameters of the quantitative determination (retention time, area and peak height, component concentration), the repeatability of the response was calculated. It does not exceed the permissible criterion ( $S_r, \%_{max}=1.30 < 2.75$ ). Validation of the developed method has been carried out in accordance with the requirements of the article 5.3.N.2 “Validation of analytical methods and tests”. The linearity ( $b=0.99$ ;  $a=1.27 \leq 5.12$ ;  $S_0=1.71 \leq 1.77$ ;  $r=0.9999 \geq 0.9916$ ); the accuracy ( $\delta=0.94 \leq 1.02$ ) and the precision ( $\Delta_z=0.72 \leq 1.02$ ) parameters meet the established criteria and testifies the possibility of the technique using in the analysis. The developed method determined the quantitative content of 1,8-cineole in the Eucalyptus tincture and in the ointment with its content. The obtained results testify the correspondence of the quantitative content of 1,8-cineole in the ointment to its contents in the tincture. The retention time of 1,8-cineole was 13.14 min. As a result of four consecutive analysis of the ointment chloroform solution, the repeatability parameter of the obtained results ( $RSD, \% = 0.68 \leq 1.92$ ) was determined. It meets the requirements. The system's suitability parameters and other chromatographic characteristics were also calculated. They indicate the possibility of using the method for the stability estimation of the ointment with Eucalyptus tincture analysis by the definition of the 1,8-cineole content.

Study of the structural and mechanical properties of the ointment with Eucalyptus tincture was carried out during one month. The presence of a hysteresis loop on the rheogram of the ointment stream indicates the presence of its thixotropic properties. Low values of the ointment structural viscosity, the corresponding values of the coefficients of dynamic dilution and the value of mechanical stability (1.44) guarantee

good consumer properties of the ointment and homogeneous distribution of its components in the basis during manufacturing. To assess the degree of rheological parameters preservation, they were determined during the month (on the 10th, 20th and 30th days of the ointment storage at a temperature of  $5\pm 3$  °C). The obtained values of structural viscosity, mechanical stability, coefficients of dynamic dilution are slightly different from each other, which confirm the stability of the ointment rheological parameters during storage.

The method of the ointment with Calendula and Eucalyptus tinctures headspace analysis was developed on the gas chromatograph GCMS-QP2010 Ultra Shimadzu with the column Rxi-5MS (30.0 m×0.25 mm×0.25 µm). As a result of the analysis, the optimum solvent for the ointment, the chloroform, has been chosen. Three markers were identified during the analysis:  $\alpha$ -pinene (47.84 %;  $t_R=8.68$  min); 1,8-cineole (40.85 %;  $t_R=12.16$  min) and  $\beta$ -pinene (11.30 %;  $t_R=10.21$  min).

The method of the gas chromatography with a mass detector on the gas chromatograph GCMS-QP2010 Ultra Shimadzu with the Rxi-5MS column (30.0 m×0.25 mm×0.25 µm) for the ointment with both tinctures stability estimation was also developed. Before the ointment solution analysis, herbal components of both tinctures were determined. Sixteen biologically active compounds were isolated in the Calendula tincture and nineteen – in the Eucalyptus tincture. The analysis of the ointment chloroform solution allowed to identify nine herbal markers: 1,8-cineole, aromandendren, (-)-globulol,  $\beta$ -eudesmol,  $\alpha$ -eudesmol, cryptomeridol,  $\alpha$ -cadinol, 9-epi-(E)-caryophyllene and viridiflorol. Ointment analysis after 18 days of storage at a temperature of  $5\pm 3$  °C showed a decrease in the concentration of the studied components. One of the ointment components is dimethylsulfoxide. Developed method also allows determining its concentration in the ointment (DMSO retention time 6.22 min).

The study of microbiological purity of the ointment with Eucalyptus tincture was carried out by two-layer inoculation method and ointment with both tinctures - by methods of deep and two-layer inoculation method for a month. During the study, the ointment was stored at  $5\pm 3$  °C. In both cases, the determination of the methodology

suitability for the analysis according to the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU) was done. In both ointments samples there are no bacteria *St. aureus* and *Ps. aeruginosa*. The total number of viable aerobic microorganisms was 20 CFU/g (in the ointment with Eucalyptus tincture) and up to 10 CFU/g (in ointment with both tinctures), and the total number of viable yeast and mildew fungi was up to 10 CFU/g in both ointments. The obtained results testify the preservation of the ointment microbiological purity for one month.

In the process of selecting and developing methods for quantitative determination of Simanovsky ointment API for its stability estimation, optimal solvents were chosen. They would allow the complete removal of the components from the ointment base. For all ointments API (phenylephrine hydrochloride, zinc oxide and menthol), optimal identification reactions were selected.

The method of menthol assay in the ointment by gas chromatography with a flame-ionization detector was developed and validated. For the analysis, the temperature program from 50 °C, via the transition temperature of 60 °C to 310 °C was chosen. This temperature program ensured a proper separation of menthol from other ointment components. The retention time of menthol was 8.00 min. System suitability parameters meet the requirements of the article 2.2.46 “Chromatographic separation techniques” of the SPhU.

Validation parameters of the technique meet the requirements. The overall uncertainty of the analysis results does not exceed the permissible criterion ( $\Delta_{As,r}=1.61 \leq \max \Delta As=3.20$  %). Linearity studies were conducted in the concentration range from  $7.812 \times 10^{-7}$  to  $2 \times 10^{-4}$  g/ml of menthol. Linear dependency parameters meet the requirements. LOD and LOQ of menthol:  $2.51 \times 10^{-7}$  g/ml and  $7.58 \times 10^{-7}$  g/ml, respectively, indicating sufficient sensitivity of the technique. The value of the systematic error meets the requirements ( $\delta, \%=0.87 < 1.02$ ), as well as the value of one-sided confidence interval ( $\Delta_z=0.38 \leq 3.20$  %). The evaluation of repeatability of results after conducting seven parallel analysis testifies to compliance with the requirements of the SPhU ( $RSD, \%=1.08 < 3.08$ ). The specificity of the method was studied. No peaks were at the place of menthol exit. The results of the quantitative determination of the

menthol content in the ointment meet the requirements of the article “Semisolid compounding dosage forms” of the SPhU (the average value of the menthol quantitative content in the ointment was 0.0398 g, it is 99.50 %).

For the phenylephrine hydrochloride quantitative determination, the method of absorption spectrophotometry in the UV region at the wavelength of 273 nm was chosen. The subordination of light absorption of the investigated solution to the Bouguer-Lambert-Ber law was checked. In accordance with the requirements of the SPhU article 5.3.N.1. Statistical analysis of the chemical experiment results<sup>N</sup> the metrological characteristics of the average result of the specific absorption index ( $A_{1cm}^{1\%} = 92$ ) were determined. They meet the established requirements.

Verification of the method based on the specificity, linearity, accuracy and precision parameters was done. The placebo solution does not significantly influence the total absorption of the test solution ( $\delta_{noise, \%} = 0.47 \leq 1.02$ ). The requirements for the linear dependency parameters are fulfilled: the free linear member ( $a = 2.31 \leq 2,32$  and  $5,12$ ), the residual standard deviation ( $S_0 = 0.47 \leq 1.69$ ), and the correlation coefficient ( $r = 0.9994 \geq 0.9924$ ). The correctness parameters ( $\delta = 0.20 \leq 1.02$ ) and precision ( $\Delta_Z = 0.39 \leq 3.20$ ) correspond to the SPhU requirements. The content of phenylephrine hydrochloride in the ointment was determined by two methods: the standard method and the specific absorption index. Metrological characteristics indicate the possibility of both calculation methods using.

For the zinc oxide assay in ointment a complexometry method was used. Since the less ointment weight was chosen for the analysis, the verification of the technique was carried out. All validation parameters meet the requirements. The average content of zinc oxide in the ointment was 99.17 %. This value fully meets the requirements of the SPhU in quantitative content. The low value of the relative standard deviation ( $RSD, \% = 0.65$ ) indicates the proper reproducibility of the analysis results.

The microbiological purity of the ointment was determined by the two-layer inoculation method for a month (the ointment was stored at a temperature of  $5 \pm 3$  °C). The obtained results indicate that there are no bacteria *E. coli*, *St. aureus* and *Ps. aeruginosa* in all samples. In the ointment samples, the number of bacteria does not

exceed 10 CFU/g, as well as the number of fungi. Thus, ointment meets the SPhU requirements by microbiological purity parameter.

The estimation of changes in the structural and mechanical properties of the ointment during the month was carried out. The ointment is characterized by a rather high value of the yield shear stress ( $99.27 Pa$ ) and a hysteresis area ( $66002.46 Pa/s$ ), due to the ointment base. The obtained rheogram confirms that the ointment has plastic-viscous and thixotropic properties. During the month, the value of the structural viscosity of the ointment is practically unchanged, as well as the value of other rheological parameters. This indicates the preservation of its rheological properties.

Using the developed and verified methods of identification and assay, the physicochemical stability of the ointment was estimated during one month. The obtained results testify its stability preservation by parameters description, identification and quantitative determination throughout the research period when the ointment was stored at a temperature of  $5 \pm 3 ^\circ C$ .

The results of the research can be used to assess the quality of compounding ointments in pharmacies and quality control laboratories, for extending their shelf life. Most of the studies described in the dissertation have been carried out for the first time (selection and development of methods for studying the stability of ointments with Calendula and Eucalyptus tinctures, Simanovsky ointment).

The results of the research were implemented to the practice of the State Service of Ukraine on Medicines and Drugs Control of different regions of Ukraine, research work of the universities of Ukraine, as well as in production pharmacies practice in Uzhgorod and Kharkiv.

The novelty of the researches is confirmed by the obtained patent of Ukraine on the useful model.

*Key words:* compounding preparations, ointments, quality control, Calendula tincture, Eucalyptus tincture, menthol.



## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	20
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ ВИМОГИ ДО ЯКОСТІ ЕКСТЕМПОРАЛЬНИХ МАЗЕЙ. ПІДХОДИ ДО АНАЛІЗУ МАЗЕЙ З РОСЛИННИМИ КОМПОНЕНТАМИ (Огляд літератури)	29
1.1 Екстемпоральна рецептура в дерматології	29
1.2 Сучасні вимоги до контролю якості мазей аптечного виготовлення	31
1.3 Контроль якості настоек календули і евкаліпту окремо та у складі різноманітних лікарських форм	33
1.4 Методики кількісного визначення ментолу у складі лікарської рослинної сировини та лікарських засобів	40
Резюме	46
РОЗДІЛ 2 ХАРАКТЕРИСТИКА ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МЕТОДІВ АНАЛІЗУ	48
2.1 Аналіз препаратів промислового виробництва з евкаліптом, календулою та ментолом. Обґрунтування та вибір об'єктів дослідження	48
2.2 Характеристика методів дослідження	57
2.2.1 Методики кількісного визначення компонентів мазей	58
2.2.2 Випробування мікробіологічної чистоти мазей	60
2.2.3 Дослідження реологічних характеристик мазі	63
Висновки до розділу 2	65
РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ МАЗЕЙ З НАСТОЙКАМИ ЕВКАЛІПТУ ТА КАЛЕНДУЛИ. ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЧИСТОТИ ТА РЕОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ	67

3.1	Розробка методу ГХ-МС для вивчення стабільності мазі з настойкою евкаліпту	68
3.2	Розробка методики ГХ-ПД для кількісного визначення 1,8-цинеолу в складі мазі з настойкою евкаліпту	72
3.3	Оцінка мікробіологічної чистоти мазі з настойкою евкаліпту	80
3.4	Вивчення реологічних параметрів мазі з настойкою евкаліпту	82
3.5	Розробка методу ПФА для вивчення стабільності мазі з настойками календули та евкаліпту	86
3.6	Розробка методики ГХ-МС аналізу мазі з настойками календули та евкаліпту для вивчення її стабільності	91
3.7	Оцінка мікробіологічної чистоти мазі з настойками евкаліпту та календули	98
	Висновки до розділу 3	101
	<b>РОЗДІЛ 4 ВИБІР ТА РОЗРОБКА МЕТОДИК ІДЕНТИФІКАЦІЇ І КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АФІ МАЗІ СИМАНОВСЬКОГО. ОЦІНКА ЇЇ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЧИСТОТИ ТА ЗБЕРЕЖЕННЯ РЕОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ</b>	105
4.1	Вибір методик ідентифікації АФІ мазі	105
4.2	Розробка та валідація методики кількісного визначення ментолу	109
4.3	Вибір та верифікація методики кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду	116
4.4	Верифікація методики кількісного визначення цинку оксиду	130
4.5	Оцінка мікробіологічної стабільності мазі	136
4.6	Визначення реологічних параметрів мазі та їх оцінка в	138

процесі зберігання	
4.7 Вивчення фізико-хімічної стабільності мазі	142
Висновки до розділу 4	145
ВИСНОВКИ	149
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	152
ДОДАТКИ	170

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

- АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт;  
ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;  
ГХ – газова хроматографія;  
ГХ-МС – газова хроматографія з мас-детектором;  
ГХ-ПД – газова хроматографія з полуменево-іонізаційним детектором;  
ДМСО – диметилсульфоксид;  
ЕЛЗ – екстемпоральні лікарські засоби;  
КУО/г – колонієутворюючі одиниці в 1,0 г зразків;  
ЛЗ – лікарський засіб;  
ЛРС – лікарська рослинна сировина;  
ЛФ – лікарська форма;  
МВ – межа виявлення;  
МКВ – межа кількісного визначення;  
МЛФ – м'яка лікарська форма;  
ПФА – парофазний аналіз;;  
ПФЕ – парофазна екстракція;  
РХ – рідинна хроматографія;  
СЗ – стандартний зразок;  
ТФМЕ – твердофазна мікроекстракція.

## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми дослідження

З давніх часів для лікування дерматологічних захворювань з успіхом застосовуються м'які лікарські форми (МЛФ). Не втрачають своєї популярності вони і в екстемпоральному виготовленні. Часто до їх складу вводять екстракти з лікарської рослинної сировини (ЛРС). За рахунок поєднання дії комплексу біологічно активних речовин вони з успіхом використовуються як для лікування багатьох захворювань шкіри (рани, виразки, опіки, тріщини), так і різних застудних захворювань. За рахунок меншої кількості побічних ефектів такі препарати є безпечнішими, ніж їх синтетичні аналоги, тому можуть застосовуватись протягом тривалого часу без завдання значної шкоди пацієнту. З огляду на це обов'язковою вимогою до мазей аптечного виготовлення є гарантія їх якості.

Незважаючи на широке обговорення питання необхідності належного контролю якості екстемпоральних лікарських форм (ЛФ) та вивчення їх стабільності, кількість наукових публікацій з даного питання досить обмежена, що свідчить про актуальність проведення таких досліджень. Екстемпоральні препарати не проходять реєстрацію на державному рівні, однак повинні відповідати за якістю препаратам промислового виробництва, зареєстрованим на фармацевтичному ринку. Для вивчення їх стабільності повинні використовуватись лише валідовані методики, а в процесі контролю якості дослідження необхідно проводити за всіма фармакопейними вимогами. Що стосується якості МЛФ, протягом їх зберігання не повинен змінюватись колір, запах, кількісний вміст активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ), вони мають відповідати вимогам Державної Фармакопеї України (ДФУ) щодо мікробіологічної чистоти та зберігати свою структуру (консистенцію).

До складу більшості мазей аптечного виготовлення для лікування різноманітних дерматологічних захворювань входять один або декілька інгредієнтів рослинного походження. Аналіз таких препаратів вимагає розробки

та застосування сучасних хроматографічних методів аналізу, які можуть бути використані як для контролю якості та вивчення стабільності мазей за ідентифікованими маркерами, так і для кількісного визначення конкретних АФІ.

Контроль якості екстемпоральних мазей за сучасними фармакопейними вимогами дозволить підтвердити їх відповідність чинним вимогам та проводити вивчення стабільності конкретних ЛФ з використанням сучасних методів аналізу. Такі дослідження в майбутньому будуть корисними для вивчення можливості збільшення термінів зберігання екстемпоральних ліків, які готуються про запас. Тим паче, методи високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та газової хроматографії (ГХ) наведені як основні при визначенні кількісного вмісту АФІ мазей аптечного виготовлення в Керівництві для аптечних працівників Фармакопеї США, яка містить найширші вимоги до контролю якості та виготовлення екстемпоральних ліків.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами**

Робота є частиною наукових досліджень, що проводяться співробітниками Національного фармацевтичного університету в напрямку контролю якості лікарських засобів аптечного виготовлення, розробки і валідації методик ідентифікації та кількісного визначення їх АФІ. Дисертація виконана у відповідності з планом науково-дослідних робіт НФаУ за темою «Розробка та валідація методів контролю якості лікарських засобів аптечного і промислового виробництва» (№№ державної реєстрації 0108U000376 та 0114U000949), ПК «Фармація» МОЗ України та НАМН України.

### **Мета і завдання дослідження**

Метою роботи був вибір, розробка та валідація методик ідентифікації і кількісного визначення АФІ мазей аптечного виготовлення з настоянками евкаліпту, календули та ментолом для подальшого вивчення їх стабільності, а також контроль якості мазей згідно з наведеними в статті «М'які лікарські засоби, виготовлені в аптеках» ДФУ вимогами. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

Проаналізувати існуючі методики контролю якості настоек календули і евкالیпту, а також ментолу окремо та в складі ЛФ;

Провести аналіз рецептури з ментолом та настоянками календули і евкالیпту, які зустрічаються в практиці виробничих аптек ряду областей України, обрати для подальших досліджень ЛФ, які готуються про запас в більшості аптек;

Експериментальним шляхом обрати оптимальні розчинники і схеми пробопідготовки для контролю якості мазей та виділення їх АФІ для подальшого проведення їх кількісного визначення і вивчення стабільності;

Обрати можливі методики контролю якості мазей з настоянками календули та евкالیпту методами хроматографії, визначити маркери для вивчення стабільності мазей;

Провести ідентифікацію та кількісне визначення АФІ досліджуваних мазей, розробити відповідні методики аналізу та провести їх валідацію або верифікацію для оцінки можливості їх подальшого використання для контролю якості та вивчення стабільності мазей;

За результатами досліджень провести оцінку мікробіологічної чистоти мазей відповідно до сучасних вимог ДФУ протягом місяця;

Оцінити ступінь збереження реологічних властивостей мазей за проведеними дослідженнями з визначення структурно-механічних властивостей мазей.

*Об'єкт дослідження* – контроль якості і стабільності мазей аптечного виготовлення, що містять настоянки календули, евкالیпту та ментол.

*Предмет дослідження* – методики ідентифікації та кількісного визначення АФІ настоек календули і евкالیпту з використанням методів ГХ (ГХ з мас-детектором (ГХ-МС), ГХ з полуменево-іонізаційним детектором (ГХ-ПІД), ГХ методом парофазного аналізу (ГХ-ПФА)); методики ідентифікації та кількісного визначення ментолу, фенілефрину гідрохлориду і цинку оксиду; оцінка мікробіологічної чистоти та збереження структурно-механічних властивостей мазей.

## **Методи дослідження**

Ідентифікацію АФІ мазі Симановського проводили з використанням хімічних реакцій; для ідентифікації компонентів настоек календули та евкالیпту використовували методи ГХ-ПФА та ГХ-МС; для кількісного визначення АФІ мазей використовували методи абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області, ГХ-ПД та титриметрії (метод комплексонометрії). Мікробіологічну чистоту мазей оцінювали методами двошарового і глибинного висівання. Вивчення реологічних параметрів мазей здійснювали з використанням ротаційного віскозиметра. Для обробки результатів досліджень використовували статистичний аналіз результатів хімічного експерименту. Валідацію та верифікацію методик здійснювали за вимогами ДФУ. Для обробки даних використовували стандартний пакет програм Microsoft Office.

## **Наукова новизна отриманих результатів**

Вперше розроблено методики для контролю якості та вивчення стабільності мазей аптечного виготовлення з настоянками календули та евкالیпту, а також мазі Симановського, які готуються про запас в багатьох виробничих аптеках України.

Розроблені методики ідентифікації біологічно активних компонентів мазей з настоянками методами ГХ (ГХ-ПФА та ГХ-МС). Вперше розроблена та валідована методика кількісного визначення 1,8-цинеолу в мазі з настоянкою евкالیпту методом ГХ-ПД.

Вперше обрані оптимальні розчинники та схеми виділення для проведення ідентифікації та кількісного визначення АФІ мазі Симановського. Вперше розроблена та валідована методика кількісного визначення ментолу в складі мазі Симановського методом ГХ-ПД. Здійснена верифікація методик кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області та цинку оксиду методом комплексонометрії в мазі. Доведена можливість застосування методик для здійснення контролю її якості та вивчення стабільності.



Вперше проведено оцінку мікробіологічної чистоти та збереження реологічних параметрів досліджуваних мазей протягом місяця при їх зберіганні за температури  $5\pm 3$  °С.

Вперше вивчена фізико-хімічна стабільність мазі Симановського з використанням розроблених та верифікованих методик протягом місяця при її зберіганні за температури  $5\pm 3$  °С.

Новизна досліджень підтверджена патентом України на корисну модель (Спосіб кількісного визначення ментолу в складі комбінованої екстемпоральної мазі методом газової хроматографії: патент України на корисну модель № 126228) та інформаційним листом про нововведення в системі охорони здоров'я № 66-2018.

### **Практичне значення отриманих результатів**

Розроблені методики ГХ-ПФА та ГХ-МС можуть бути використані для вивчення стабільності мазей за ідентифікованими маркерами та контролю їх якості. Методика кількісного визначення 1,8-цинеолу методом ГХ-ПД в складі мазі з настойкою евкалипту може бути використана для вивчення її стабільності та визначення можливості збільшення терміну придатності.

Розроблені, верифіковані та валідовані методики ідентифікації і кількісного визначення ментолу, фенілефрину гідрохлориду та цинку оксиду можуть бути внесені до технологічної інструкції з виготовлення мазі Симановського, оскільки вона готується про запас. Методики ідентифікації та кількісного визначення компонентів мазей можуть бути використані при розробці монографій на досліджувані ЛФ для внесення до ДФУ.

Отримані результати вивчення мікробіологічної чистоти, фізико-хімічної стабільності мазі Симановського та оцінка зміни її реологічних параметрів свідчать про можливість збільшення терміну придатності мазі до 30 днів при зберіганні за температури  $5\pm 3$  °С.

Окремі результати дисертаційної роботи впроваджені у навчальний процес та наукову діяльність кафедр Одеського національного медичного університету (акт впровадження від 22.05.2018 р.), Національного медичного університету

ім. О. О. Богомольця (акт впровадження від 28.08.2018 р.), ДВНЗ Тернопільського державного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського (акт впровадження від 05.06.2018 р.), Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (акт впровадження від 29.08.2018 р.), Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (акт впровадження від 07.06.2018 р.), Запорізького державного медичного університету (акт впровадження від 21.08.2018 р.), в практичну діяльність територіальних Державних служб України з лікарських засобів та контролю за наркотиками у Волинській (акт впровадження від 20.09.2017 р.), Сумській (акт впровадження від 03.10.2017 р.) та Житомирській (акти впровадження від 29.05.2018 р.) областях та виробничих аптек міста Ужгород (акт впровадження від 11.07.2017 р.), Житомир (акти впровадження від 23.05.2018 р.), Харків (акт впровадження від 03.07.2018 р.) та Хмельницький (акти впровадження від 30.05.2018 р.).

#### **Особистий внесок здобувача**

Безпосередньо автором проведено:

- інформаційний пошук та аналіз літературних джерел стосовно існуючих методик ідентифікації і кількісного визначення АФІ настоек евкалипту, календули, ментолу окремо, а також в складі лікарських препаратів;
- аналіз зареєстрованих лікарських засобів з календулою, евкалиптом і ментолом на фармацевтичному ринку України, а також рецептури виробничих аптек Житомирської, Хмельницької, Сумської, Харківської та Волинської областей, участь у виборі об'єктів дослідження;
- пробопідготовку при проведенні досліджень з розробки методик ідентифікації та кількісного визначення АФІ мазей з настоянками та мазі Симановського різними методами ГХ та титриметрії;
- ідентифікацію та кількісне визначення АФІ мазі Симановського, вивчення її хімічної стабільності;
- визначення валідаційних параметрів і статистичну обробку отриманих даних кількісного визначення досліджуваних компонентів;

– оцінку результатів вивчення мікробіологічної чистоти та реологічних параметрів досліджуваних мазей.

Разом з науковим керівником, к. фарм. н., доц. Савченко Л. П. обрано придатні хроматографічні та титриметричні методи для контролю якості досліджуваних мазей; проведений критичний аналіз та узагальнення результатів експериментальних досліджень.

Дослідження з оцінки мікробіологічної чистоти виконано на базі кафедри біотехнології НФаУ під керівництвом проф. Стрілець О. П., хроматографічні дослідження проведені на базі кафедри аналітичної та токсикологічної хімії Литовського університету наук про здоров'я (м. Каунас, Республіка Литва) під керівництвом проф. Л. Іванаускаса, дослідження з вивчення реологічних параметрів мазей проводили на кафедрі промислової фармації НФаУ під керівництвом доц. Кухтенко Г. П. Наукові роботи опубліковані у співавторстві з Савченко Л. П., Георгіянци В. А., Бевз Н. Ю., Стрілець О. П., Іванаускасом Л., Барстігене З., Терещенко Л. В. Співавторами наукових праць є науковий керівник та науковці, спільно з якими проведені дослідження.

### **Апробація результатів дисертації**

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня: VI науково-практична конференція з міжнародною участю «Управління якістю в фармації» (Харків, 17 квітня 2013); Міжнародна науково-практична конференція «Аналітична хімія у фармації» (Харків, 19-20 березня 2015); I науково-практична інтернет-конференція з міжнародною участю «Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку» (Харків, 24-25 березня 2016); VIII Національний з'їзд фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (Харків, 13-16 вересня 2016); The 7<sup>th</sup> International Pharmaceutical Conference «Science and practice 2016» (Kaunas, Lithuania, 20-21 October 2016); XI науково-практична конференція «Управління якістю в фармації» (Харків, 19 травня 2017); Міжнародна науково-практична конференція «Медичні науки: напрямки та тенденції розвитку в Україні та світі» (Одеса, 16-17 червня 2017); The 8<sup>th</sup> International Conference

«Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice» (Kaunas, Lithuania, 15 December 2017); Chemistry Conference for Young Scientists «ChemCYS 2018» (Blankenberge, Belgium, 21-23 February 2018); Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій» (Харків, 12-13 квітня 2018).

### **Обсяг і структура дисертації**

Дисертаційна робота викладена на 193 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, 4 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 2 додатків. Робота ілюстрована 46 таблицями та 30 рисунками. Список використаних джерел містить 163 найменування, з них 45 кирилицею та 118 латиницею.

**РОЗДІЛ 1**  
**СУЧАСНІ ВИМОГИ ДО ЯКОСТІ ЕКСТЕМПОРАЛЬНИХ МАЗЕЙ.**  
**ПІДХОДИ ДО АНАЛІЗУ МАЗЕЙ З РОСЛИННИМИ**  
**КОМПОНЕНТАМИ**  
**(Огляд літератури)**

1.1 Екстемпоральна рецептура в дерматології

Однією із проблем, які на сьогоднішній день виникли в медицині є значне поширення дерматологічних захворювань [27, 30]. Підвищилась захворюваність населення на контактний дерматит, екзему, грибкові ураження, псоріаз та інші хвороби [27]. Для лікування різноманітних захворювань шкіри перевага завжди надається МЛФ, оскільки вони забезпечують комплексний підхід до лікування. Найбільшою перевагою таких препаратів є можливість дії саме в місці нанесення, що попереджує необхідність його застосування на здорових ділянках шкіри та виникнення можливих побічних ефектів [143, 157]. До інших переваг мазей можна віднести прийнятну ЛФ для пацієнтів, які не можуть ковтати таблетки; вони відносно є більш стійкими, ніж рідкі ЛФ; прості у використанні; така форма є більш прийнятною для АФІ з гірким смаком та ін. [143]. На фармацевтичному ринку України МЛФ займають до 12 % серед інших препаратів промислового виробництва [27]. Велику частку такі ЛФ займають і в екстемпоральному виробництві як в Україні, так і в зарубіжних країнах.

Незамінними є екстемпоральні ліки в геріатричній практиці. Аналіз екстемпоральної рецептури для таких хворих, проведений у Волинській області, показав, що МЛФ є досить поширеними. Серед прописів зустрічаються паста левоміцетинова 10 % - 20,0; стрептоцидова 10 % – 20,0; мазі дексаметазонова 0,05 % – 20,0; саліцилова 5 % – 300,0; камфорна 10 % – 100,0 та резорцинова 2 % – 30,0. Зустрічаються також прописи з авторськими назвами: “Паста Лассара” з саліциловою кислотою та “Паста цинкова” [35].

Аналіз аптек КП “Фармація” м. Київ показав, що МЛФ займають більше 25 % в тих аптеках, які розташовані поблизу спеціалізованих лікувально-

профілактичних закладів. Серед МЛФ зустрічаються мазі, креми, гелі, пасти та лініменти. Мазі займають 7,8 % від усього їх об'єму. Серед них однокомпонентні ЛФ складають 16 %, дво- та трьох компонентні – 20 %, а 64 % займають багатокомпонентні мазі [20]. 85 % прописів складають мазі для зовнішнього застосування, 15 % – для назального застосування. Серед однокомпонентних мазей зустрічаються мазь гідрокортизонова 1 %, мазь стрептоцидова 5 та 10 %, мазь саліцилова 2, 5 і 10 %, мазь з димексидом 20 % та мазь фурацилінова 0,2 %.

Дослідження багатьох зарубіжних авторів свідчать, що найчастіше екстемпорально готують препарати для лікування дерматологічних захворювань [91, 97, 127].

Користуються попитом мазі в Республіці Таджикистан. Проведені дослідження ліків аптечного виготовлення свідчать, що МЛФ займають друге місце серед інших ЛФ (17,3 % від інших препаратів) [1].

В Австралії до 31 % складають препарати для місцевого застосування та 16 % для лікування захворювань ЛОР-органів [127]. За іншим дослідженням, проведеним в Квінсленді (Австралія) МЛФ займають до 89 % всього об'єму виготовлення екстемпоральних лікарських засобів [72]. Що одне дослідження екстемпоральної рецептури, проведене в спільноті виробничих аптек Австралії показали, що більшість препаратів аптечного виготовлення використовуються для лікування дерматологічних захворювань [99].

Дослідження, проведені у виробничих аптеках Нідерландів показали, що більшість екстемпоральних препаратів – це дерматологічні ЛФ [97].

Популярними дерматологічні препарати є в Греції та Болгарії. Найчастіше як заспокійливий засіб, для виготовлення крему з рожевою водою або основи для виготовлення інших місцевих засобів там використовують колд-крем. Для лікування акне готують саліциловий крем. Крім цього, в практиці аптек зустрічається відбілюючий крем [92]. Проведені дослідження в лікарняному комплексі провінції Лімпопо в Південній Африці показали перевагу екстемпоральних препаратів для лікування дерматологічних захворювань. Згідно

з результатами креми займають 33 %, а мазі 13,60 %. Найчастіше призначаються креми з бетаметазоном (27,9 %) та кортикостероїдами (32,9 %) [117].

Не заперечують необхідність існування екстемпоральної рецептури в Італії [71]. Незважаючи на деякий спад її виготовлення, вона не втратила своєї актуальності. На сьогоднішній день при виготовленні таких препаратів використовують різноманітні основи. Серед них є нові вуглеводневі основи, які не викликають подразнення та мають зволожуючий ефект. Такі основи можуть бути використані для приготування більшості ліків з антибіотиками, кортикостероїдами та ін. Крім цього, часто використовуються крем-гелеві основи, виготовлені на основі полімерних емульгаторів. Вони містять меншу кількість жиру та характеризуються приємним косметичним ефектом, за рахунок чого можуть використовуватись у приготуванні препаратів для лікування захворювань шкіри обличчя. Рідше використовуються основи у вигляді емульсій типу вода в маслі, оскільки утворюють плівку на поверхні шкіри. Однак, і вони знайшли широке застосування в приготуванні препаратів для лікування псоріазу або хронічної екземи. Серед ліків аптечного виготовлення для лікування дерматологічних захворювань часто зустрічаються препарати для лікування псоріазу, акне, лишая, порушень пігментації, захворювань слизової оболонки та шкірного покриву голови.

## 1.2 Сучасні вимоги до контролю якості мазей аптечного виготовлення

Останнім часом в усьому світі широко обговорюється питання необхідності належного контролю якості екстемпоральних ЛФ, особливо тих, які готуються про запас. Європейська Фармакопея взагалі не містить статей, які стосуються виготовлення та контролю якості ліків аптечного виготовлення. Найширші вимоги до контролю якості екстемпоральних ЛФ містить Керівництво для аптечних працівників Фармакопеї США [158], опубліковане в 2012 році. Воно прийшло на зміну Фармакопеї США для аптечних працівників, виданої в 2008 році [159]. Керівництво містить загальні вимоги до виготовлення та контролю

якості ліків аптечного виготовлення. Щодо екстемпоральних мазей, загальні випробування їх якості наведені в статті 1163 “Забезпечення якості в фармацевтичному виготовленні” (“Quality assurance in pharmaceutical compounding”). Серед них є перевірка загальної маси ЛФ, рН, точка плавлення, а для кількісного визначення рекомендується використовувати методи ВЕРХ та ГХ. Крім цього, до Керівництва входить стаття 795 “Фармацевтичне виготовлення – нестерильні препарати” (“Pharmaceutical Compounding – Nonsterile Preparations”), яка описує загальні вимоги до виготовлення даних ЛФ, їх характеристику та основні випробування.

Статті на екстемпоральні ЛФ входять до складу ДФУ. Вперше вимоги до контролю їх якості були введені в Доповнення 2 до першого видання ДФУ в 2008 році. До нього введено підрозділ 5.N.1. “Екстемпоральні лікарські засоби”. В першій його статті 5.N.1.1. “Екстемпоральні нестерильні лікарські засоби” наведена характеристика загальних видів внутрішньоаптечного контролю даних препаратів: письмовий, опитувальний, органолептичний, фізичний, хімічний та контроль при відпуску. Вони співзвучні з вимогами Наказу МОЗ України № 812 від 17.10.2012 р. “Про затвердження Правил виробництва (виготовлення) та контролю якості лікарських засобів в аптеках”. Крім цього, до Доповнення 4 до першого видання ДФУ, виданого в 2011 році, вперше введено статтю 5.N.1.4. “Порошки екстемпоральні”.

У другому виданні ДФУ вимоги до контролю якості екстемпоральних ЛФ значно розширені. Вони введені у вигляді підрозділу “Лікарські засоби, виготовлені в аптеках” [9], який повністю стосується правил виготовлення та контролю якості ЛЗ аптечного виготовлення і є національним. Крім повної характеристики видів внутрішньоаптечного контролю додані вимоги до окремих ЛФ: мазей, супозиторіїв та песаріїв. До даного розділу вперше увійшли загальні статті “М’які лікарські засоби, виготовлені в аптеках”, а також “Супозиторії та песарії, виготовлені в аптеках”. Новими серед введених вимог є необхідність оцінки факторів, які можуть впливати на якість препаратів. Вони наведені в загальній статті “Лікарські засоби” ДФУ [8].



Згідно з вимогами статті “М’які лікарські засоби, виготовлені в аптеках” [9] контроль якості МЛФ повинен проводитись за такими параметрами:

- опис (контролюють колір, запах, консистенцію та однорідність препарату), в процесі зберігання не повинні з’являтися ознаки нестабільності ЛФ;
- де застосовно – перевіряють загальну масу або об’єм препарату, в статті наведені допустимі відхилення при проведенні таких досліджень;
- де застосовно проводять кількісне визначення (допустиме відхилення у вмісті компонентів  $\pm 10\%$ ).

Крім цього, в статті вказано, що МЛФ аптечного виготовлення повинні відповідати вимогам загальних статей “Нестерильні ЛЗ, виготовлені в аптеках” та вимогам відповідних загальних статей на готові ЛФ. За вимогами статті “Нестерильні ЛЗ, виготовлені в аптеках” мазі аптечного виготовлення повинні відповідати вимогам щодо мікробіологічної чистоти (стаття 5.1.4. “Мікробіологічна чистота нестерильних ЛЗ та субстанцій для фармацевтичного застосування” ДФУ). Крім цього, загальні статті на готові МЛФ містять вимоги до відповідності встановленим реологічним параметрам. Дані вимоги були введені ще в першому виданні ДФУ.

Крім ДФУ, вимоги до контролю якості екстемпоральних ЛФ сьогодні регулюються Наказом МОЗ України № 812 від 17.10.2012 р. “Про затвердження Правил виробництва (виготовлення) та контролю якості лікарських засобів в аптеках” [29], який прийшов на зміну Наказу МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р. Однак, щодо вимог до внутрішньоаптечного контролю якості, описаних в даному Наказі, вони аналогічні попередньому.

### 1.3 Контроль якості настоек календули і евкалипту окремо та у складі різноманітних лікарських форм

Настойки з ЛРС (настойка календули, евкалипту, арніки, валеріани, глоду, м’яти, перцю, звіробою, полину, собачої кропиви та ін.) часто є основними

компонентами ЕЛЗ для лікування дерматологічних захворювань. Найбільшою популярністю серед них користуються спиртові настойки календули та евкаліпту.

Спиртова настойка календули має антимікробні, протизапальні, антиоксидантні та ранозагоювальні властивості, що обумовлено вмістом флавоноїдів, флавонолових глікозидів і антоціанів [95]. Водно-метанольний, водний та етанольний екстракти календули характеризуються високою антиоксидантною та антимікробною активністю по відношенню до *E. coli*, *S. typhi*, *St. aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus nigeri*, *S. epidermidis*, *Klebsiella sp.*, *P. aeruginosa* більшість з яких часто є збудниками хвороб шкіри [104, 107, 136]. Крім антимікробних властивостей етанольний екстракт в різній концентрації проявляє протигрибкові та противірусні властивості по відношенню до різних штамів патогенів [51, 101]. При введенні в концентрації 250 мг/кг 70 % спиртовий розчин календули виявив антиоксидантну, антиноцицептивну, гіпотермічну, болезаспокійливу та протизапальну активність [84]. Дослідження водного та метанольного екстракту квіток календули та їх екстракту в ацетоні виявили високу антимікробну активність по відношенню до *St. aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Klebsiella spp.* та *P. aeruginosa* [59].

Завдяки даним властивостям екстракти з квіток та листя календули широко використовуються в медичній практиці в різноманітних ЛФ [101, 105, 110, 140]. Найпопулярнішою серед них є мазь календули (як однокомпонентна, так і комбінована), яка використовується для лікування багатьох дерматологічних захворювань (рани, виразки, екзема, нариви, опіки, варикоз та геморої) [52, 84, 101, 118]. Доведено, що застосування гелю з її спиртовим екстрактом проявляє ранозагоювальний ефект завдяки антимікробній та антиоксидантній дії [122].

Головним фармакологічним ефектом екстрактів з листя евкаліпту є антимікробний. Така дія евкаліпту обумовлена наявністю ефірної олії, головним компонентом якої є 1,8-цинеол. Він проявляє сильні антимікробні властивості по відношенню до різних видів бактерій, має протизапальні, жарознижувальні, ранозагоювальні, муколітичні, стимулюючі та тонізуючі властивості. Листя евкаліпту є одними з основних компонентів рідини для полоскання порожнини

рота, різноманітних мазей, їх екстракт ефективний в лікуванні акне (пригнічує життєдіяльність *P. acnes*) [60, 88, 101].

В одному із проведених досліджень етанольний екстракт листя евкаліпту показав високу антимікробну активність по відношенню до *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* [61, 135] та *Pr. vulgaris* [135]. Спиртова настоянка евкаліпту виявила високу антибактеріальну активність по відношенню до *St. aureus*, стійкого до дії метициліну [57]. Доведено наявність антимікробної дії комбінованої мазі з екстрактом листя евкаліпту кулястого проти стійких штамів *Pseudomonas spp.*, яка може бути використана для лікування ран шкіри [126]. Густі екстракти листя евкаліпта прутовидного та кулястого входять до складу масляного та спиртового розчину хлорофіліпту, який запропоновано використовувати в складі протизапальної мазі для зовнішнього застосування [43].

Більшість запропонованих на сьогоднішній день методів аналізу ефірних олій обох рослин – це різноманітні методи ГХ. Найчастіше для ідентифікації компонентів обох олій використовують метод ГХ-МС. Основною сферою його використання є оцінка зміни компонентного складу олій в залежності від різноманітних умов та періодів вирощування, а також оцінка ефективності використання різних видів екстракції біологічно активних сполук в процесі пробопідготовки. Крім того, методи ГХ часто використовуються для оцінки якості ЛФ, які містять дані ефірні олії.

Методом ГХ–МС проведений аналіз ефірної олії календули зі split-співвідношенням 1:30.0 з використанням капілярної колонки 60 м×0.25 мм [121]. Серед рослинних компонентів в ній були ідентифіковані  $\alpha$ -пінен, камфен, сабінен, лимонен, 1,8-цинеол, транс- $\beta$ -о-цимен, дигідротаетон, карвенон, артемізія кетон,  $\alpha$ -пінен епоксид, нео-алло-оцимен, транс-міоксид, цис-тагетон, камфора,  $\alpha$ -терпінолен,  $\beta$ -каріофілен, транс-пінокарвеол, вербенон, транс-оціменон, ізопіперітенон, 2-метил-6-гептен-3-ол, спатуленол.

Метод ГХ-МС після твердофазної мікроекстракції (ТФМЕ) використаний для оцінки зміни кількісного вмісту основних компонентів олії календули ( $\alpha$ -кадінолу,  $\alpha$ -туйону,  $\gamma$ -мууролену, t-кадінолу) в залежності від внесення

різноманітних видів добрив [115]. Також даний метод використаний для оцінки зміни вмісту ефірної олії календули та його складу в залежності від кількості внесеного в ґрунт калію. Основними компонентами ефірної олії виявились  $\alpha$ -кадінол,  $\tau$ - та  $\gamma$ -кадінен [111].

Методом рівноважної парової фази ідентифіковано 34 сполуки у сировині календули лікарської, які запропоновані як маркери для контролю її якості [3].

Більше 18 компонентів ідентифіковані в ефірній олії календули методом ГХ-МС, вирощеної в Узбекистані. В ході досліджень виділені  $\alpha$ -аморфен (1,926 %),  $\gamma$ -кадінен (11,598 %), 1Н-циклопропазулен 4-олдекагідро-1 (0.825 %), вірідіфлорол (2.029 %),  $\beta$ -кубебен (3.809 %), t-1-муурололнафталенол (8.522 %) [87]. Метод ГХ-МС використаний для визначення зміни концентрації компонентів ефірної олії календули зі збільшенням періоду росту рослини [123]. Сесквітерпени ( $\alpha$ -кадінен,  $\alpha$ -кадінол, t-мууролол, епі-біциклосесквіфеландрен) та монотерпени (лимонен, 1,8-цинеол, транс- $\beta$ -оцимен) показали найвищу кореляцію зі зміною величини віку рослини.

ГХ-МС використовують для визначення вмісту компонентів ефірної олії календули, отриманої з використанням різних методів.  $\alpha$ -кадінол та епі- $\alpha$ -мууролол були визначені після вилучення методом парової дистиляції;  $\alpha$ -копайєн – після парофазної ТФМЕ;  $\gamma$ -мууролен та  $\beta$ -каріофілен – після парофазної екстракції (ПФЕ) з використанням холодного режиму взяття ін'єкції. Основні компоненти олії –  $\delta$ -кадінен,  $\gamma$ -кадінен,  $\alpha$ -мууролен,  $\gamma$ -мууролен були ідентифіковані при використанні всіх способів екстракції [55]. Борнеол та оксид каріофілену були ідентифіковані в ефірній олії, отриманій методом гідродистиляції;  $\alpha$ -туйон – після екстракції органічними розчинниками;  $\alpha$ -кадінен та  $\delta$ -кадінен були визначені як основні компоненти при використанні для екстракції обох методів [67].

Методами ГХ та ГХ-МС з використанням колонки 30 м×0.25 мм визначено кількісний вміст ефірних олій календули, отриманих з використанням різних видів екстракції. Основними ідентифікованими компонентами були  $\alpha$ -кадінол (11.7–29.1 %),  $\delta$ -кадінен (3.2–20.3 %),  $\gamma$ -кадінен (1.5–11.4 %) та кадіна-3,9-дієн

(0.4–11.2 %). Зразки ефірної олії, отримані CO<sub>2</sub>-екстракцією виявились найбільш багатими на біологічно активні компоненти. Вони містили  $\alpha$ -гур'юнен,  $\beta$ -каріофілен,  $\beta$ -гур'юнен, *cis*-муурола-4(14)-5-дієн та  $\alpha$ -гумулен [129].

Методом ГХ-ПД та ГХ-МС оцінено склад та вихід компонентів ефірної олії календули при використанні різних видів CO<sub>2</sub>-екстракції [53]. Основними її компонентами, визначеними обома методами були  $\alpha$ -кадінол (26.54 %),  $\tau$ -кадінол та  $\tau$ -мууролол (9.80 %),  $\gamma$ -кадінен (2.99 %), гексадеканоєва кислота (2.95 %) та ледан (2.45 %). Крім того, ефірні олії, отримані методом CO<sub>2</sub>-екстракції містили  $\delta$ -кадінен (6.50–19.87 % при надкритичних та 16.09–19.41 % при субкритичних умовах), який не був виділений в зразках ефірної олії, отриманої методом парової дистиляції.

З використанням split-ін'єкції (split-співвідношення 1:50) методом ГХ-МС в метанольному екстракті квіток *Calendula officinalis* ідентифіковані сім сполук. Основною ідентифікованою сполукою був (1 $\alpha$ , 3 $\beta$ , 4 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 7 $\beta$ , 8 $\beta$ )-2-окса-6-азатрицикло[3.3.1.1(3,7)]декан,4,8-дийодо-6-(фенілсульфоніл) (21.419 %). Дослідження проводились з використанням колонки 25 м×0.2 мм [134]. Метод ГХ-МС з використанням режиму ін'єкції splitless використаний для водно-спиртового екстракту календули. Серед основних ідентифікованих сполук були  $\alpha$ -кадінол,  $\alpha$ -туйон, 4-терпінеол, борніл ацетат, 1,8-цинеол,  $\beta$ -туйон. Ідентифікацію проводили після екстракції сумішню ізооктану та ацетонітрилу з використанням капілярної колонки 30 м×0.25 мм [104].

Визначення кількісного вмісту флавоноїдів у водно-метанольному екстракті листя та квіток календули проводили методом спектрофотометрії після утворення комплексу з алюмінієм з максимумом поглинання при 420 нм [107]. Визначення фенольних сполук проводили методом оберненофазної ВЕРХ у водно-метанольному екстракті листя та квіток календули з використанням колонки С-18 (250 мм×4,6 мм) та градієнтного елюювання, елюенти – суміш 0,1 % розчину мурашиної кислоти у воді та ацетонітрилу [107]. Проведене визначення вмісту фенольних сполук на рідинному хроматографі з мас-детектором з використанням

колонки C18 (150 мм×2.1 мм) у водно-метанольному екстракті листя та квіток календули [107].

Метод РХ з мас-детектором застосований для визначення фенольних сполук у 79 % (v/v) спиртовому екстракті календули. Для аналізу використана колонка C18 5U (100 мм×3.2 мм×5μm) [52].

Методом ВЕРХ (колонка 150 мм×2,1 мм) проведений аналіз вмісту фенольних сполук у водному екстракті календули та методом ГХ-МС (колонка 25 м×0,32 мм) після дериватизації [25].

Методом ГХ-МС проведене визначення компонентів ефірної олії евкаліпту після гідродистиляції. Зразки олії, розчинені в гексані, проаналізовані з використанням split-співвідношення 1:20. Було ідентифіковано 12 речовин, серед яких 1,8-цинеол, α-пінен, β-мірцен, β-пінен, лимонен, α-феландрен, γ-терпінен, ліналоол, пінокарвеол, терпінен-4-ол та α-терпінеол [82].

Розчини ефірної олії евкаліпту після субкритичної водної екстракції та після гідродистиляції проаналізовані методом ГХ-МС з режимом ін'єкції splitless (split-співвідношення 1:4). В результаті аналізу в ньому були визначені 1,8-цинеол, α-пінен, лініліл пропаноат, β-пінен, β-мірцен [108]. В іншому дослідженні методом ГХ-МС аналізу в ефірній олії евкаліпту були ідентифіковані 1,8-цинеол (83.89 %), (+) лимонен (8.16 %), α-пінен (4.15 %) та о-цимен (2.93 %) [66].

Методом ГХ-МС проведений аналіз ефірної олії евкаліпту кулястого [145]. Аналіз проводили з використанням капілярної колонки 30 м×0,25 мм×0,25 μm та газу-носію гелію зі швидкістю потоку 1 мл/хв. В процесі аналізу виділено 50 сполук. Серед них ідентифіковано 4 окиснених монотерпени: 1,8-цинеол (72,72 %), α-терпінеол (2,54 %), терпінен-4-ол (0,34 %) та ліналоол (0,24 %); два монотерпени: α-пінен (9,22 %), β-пінен (0,4 %); три сесквітерпени: α-еудесмол (0,39 %), глобулол (2,77 %), епіглобулол (0,44 %). Крім цього, серед основних сполук виділені α-терпінеол ацетат (3.1 %), гераніл ацетат (0.71 %), L-пінокарвеол (0.36 %), β-сабінен (0.25 %) та терпінолен (0.19 %).

Методом ГХ-МС проведений аналіз ефірної олії евкаліпту кулястого, вирощеного в Алжирі [132] з використанням капілярної колонки

30 м×0.25 мм×0.25 μм та співвідношенням split 1:20; газ-носієм азот. В процесі аналізу виділено 14 сполук, які складають 90,98 % ефірної олії. Більшість виділених сполук є окисненими монотерпенами. Основними компонентами були 1,8-цинеол (51.08 %), α-пінен (24.6 %), L-пінокарвеол (9.98 %) та глобулол (2.81 %). Крім цього, були виявлені α-терпінеол, міртенол, камфен та *cis*-карвеол.

Метод ПФЕ та ГХ-МС запропонований для аналізу ефірної олії евкаліпту прутувидного [45]. При ПФА ідентифіковано 76 компонентів з ймовірністю 90 %. В ході дослідження виділено 10 основних компонентів: α-пінен, камфен, β-пінен, α-феландрен, цимен, 1,8-цинеол, γ-терпінен, 4-терпінеол, α-терпінеол, аромандрен, β-еудесмол, які складають 92,5 % легкої фази. При ПФА з ТФМЕ ідентифіковано 87 компонентів з ймовірністю 90 %.

Запропонований метод ГХ-ПФА листя евкаліпту прутувидного з подальшим використанням методу ГХ-ПД з колонкою 30 м×0,32 мм. В результаті аналізу на хроматограмі виявлено 43 піка [44].

Запропонований метод ГХ-ПД та ГХ-МС для аналізу ефірної олії декількох видів евкаліпту [65]. При проведенні аналізу методом ГХ-ПД використана колонка 30 м×0,32 мм×0,25 μм, газ-носієм азот зі швидкістю потоку 2 мл/хв. Зразки олії розчиняли в очищеному гексані. Для проведення аналізу методом ГХ-МС використана та ж сама колонка і газ-носієм гелій. При проведенні аналізу в ефірній олії виділено 144 сполуки, серед яких 25 – основні компоненти. До основних компонентів віднесені 1,8-цинеол (4.5-70.4 %), криптон (0.0-20.9 %), α-пінен (1.0-17.6 %), p-цимен (0.8-16.7 %), α-терпінеол (0,6-10,3 %), транс-пінокарвелол (0.8-7.0 %), феландраль (0.0-6.6 %), куміналь (0.0-6.6 %), глобулол (0.6-6.2 %), лимонен (0.4-4.4 %), аромандрен (0.1-3.6 %), спатуленол (0.1-3.2 %) та терпінен-4-ол (0.3-3.0 %).

Комбінація даних методів для аналізу ефірної олії евкаліпту запропонована також з використанням капілярної колонки 50 м×0.32 мм×1.25 μм та аналогічних газів-носіїв з швидкістю потоку 1 мл/хв [58]. Основними ідентифікованими компонентами були 1,8-цинеол (22.35 %), лимонен (7.01 %), соланол (6.05 %), β-пінен (5.20 %), трансвербенол (4.02 %), терпінен-4-ол (3.10 %), арістолен (2.35 %),



терпініл ацетат (2.10 %), ізосатівен (1.85 %), сабінен (1.49 %),  $\alpha$ -мірцен (1.15 %) та  $\alpha$ -терпінеол (1.10 %).

Методом ГХ-МС та ГХ-ПІД проведений аналіз ефірної олії евкаліпту кулястого, зібраного в Індії [70]. Для аналізу використана колонка 60 м $\times$ 0.25 мм $\times$ 0.25  $\mu$ м, газ-носії гелій, швидкість потоку 3 мл/хв та split-співвідношення 1:80. В процесі аналізу ідентифіковано 31 сполуку. Із них 61,50 % склали окиснені монотерпени та 37,90 % монотерпени. Головними компонентами ефірної олії були 1,8-цинеол (33.6 %),  $\alpha$ -пінен (14.2 %) та D-лімонен (10.1 %).

ГХ-МС метод запропонований для аналізу стабільності мазей, які містять ефірну олію евкаліпту. Аналіз проводили після розчинення зразків у хлороформі шляхом визначення відсоткового вмісту олії в мазі. За даним показником визначали стабільність трьох мазей протягом 6 місяців. В процесі аналізу використовували показники, наведені в сертифікаті якості, в тому числі відсотковий вміст ефірної олії евкаліпту в мазях [146]. Розроблена методика кількісного визначення фенолоальдегідів у складі мазі хлорофіліпту з гідрофільною основою методом прямої абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області за максимумом поглинання при 278 нм [43].

ДФУ для аналізу спиртової настойки календули рекомендує використовувати спектрофотометрію, а для визначення компонентів олії евкаліпту – ГХ методом внутрішньої нормалізації [111].

#### 1.4 Методики кількісного визначення ментолу у складі лікарської рослинної сировини та лікарських засобів

Ментол – монотерпеновий спирт, який є основним компонентом ефірної олії м'яти [80, 109, 116, 120, 131, 141]. Входить він до складу багатьох різноманітних продуктів: лікарських препаратів, косметичних ЛЗ, пестицидів, цукерок, цигарок, жувальних гумок, лікерів, зубних паст, шампунів і мил як охолоджуючий та (або) інгредієнт, який покращує запах. Основним його джерелом є ароматичні рослини [80, 109, 116, 120, 152]. Одним із основних



ефектів ментолу є охолоджуючий [120]. Він здійснює стимулюючу дію на холодові рецептори верхніх дихальних шляхів за рахунок чого покращує носове дихання. Крім цього, ментол проявляє різноманітні фармакологічні ефекти: анальгетичний, антибактеріальний, протигрибковий, анестезуючий, підвищує проникнення інших компонентів препаратів та імуномодулюючий [98, 114, 120, 152]. За рахунок цього він входить до складу багатьох фармацевтичних препаратів: в протизапальні креми як охолоджуючий агент [98, 150], антисептики для лікування захворювань горла та рота, антигемороїдальні препарати [98], лікарські засоби для лікування закладеності носа, сонячних опіків, лихоманки, болі в м'язах [109]. Ментол є одним з основних компонентів мазі ВІК ВапоРаб, яка з успіхом застосовується для лікування застуди [81].

Також ментол є компонентом місцевих знеболюючих засобів за рахунок його здатності впливати на судини [73, 133], зменшувати свербіж, проявляти охолоджуючий та антисептичний ефекти [120]. Крім цього, ментол покращує проникнення інших лікарських речовин в шкіру. Таку його дію доведено при комбінуванні з 5-фторурацилом, пропранололом гідрохлоридом, індометацином, кетопрофеном, естрадіолом, кофеїном, гідрокортизоном, іміпраміном гідрохлоридом, тетракаїном, метилсаліцилатом та ін. [120].

На сьогоднішній день методики контролю якості ментолу входять до складу багатьох фармакопей, опубліковано статті з визначення його кількісного вмісту в складі різноманітних ЛЗ.

ДФУ [7], як і Європейська Фармакопея [90], рекомендують використовувати метод ГХ-ПІД для визначення в ментолі вмісту супутніх домішок. Як розчинник в методиці застосовується метиленхлорид. Для аналізу використовується скляна колонка 2 м×2 мм, температура ПІД 200 °С, газ-носій азот та швидкість потоку 30 мл/хв. Даний метод запропонований і в Індійській Фармакопеї з іншим розчинником (етанолом). Аналіз проводять з використанням скляної колонки або колонки з нержавіючої сталі 4 м×2 мм за температури детектора 240 °С та швидкості потоку 30 мл/хв [106].

Японська Фармакопея пропонує проводити визначення ментолу методом алкаліметрії після нагрівання на водяній бані з певною кількістю суміші дегідрованого піридину та оцтового ангідриду зі зворотним холодильником [153]. USP використовує ГХ для визначення хроматографічної чистоти ментолу з температурою детектору  $240^{\circ}\text{C}$  та колонкою  $1.8\text{ м}\times 2\text{ мм}$  [154].

Розроблено багато методів аналізу вмісту ментолу в ефірній олії м'яти різноманітними методами ГХ. Більшість досліджень проведена з використанням колонки  $30\text{ м}\times 0.25\text{ мм}$ .

Метод ГХ-МС запропонований для порівняльного аналізу складу ефірної олії м'яти, вирощеної в різних регіонах Індії одним із основних компонентів якої був ментол. Дослідження проведені на колонці  $30\text{ м}\times 0.25\text{ мм}$  зі split-співвідношенням 1:50, газом-носієм гелієм зі швидкістю потоку  $1,1\text{ мл/хв}$  [68].

Запропоновані методи ПФА та ГХ-ПД для кількісного визначення ментолу в листях м'яти. Для аналізу використана колонка  $30\text{ м}\times 0.25\text{ мм}\times 0.25\text{ }\mu\text{м}$ , газ-носієм водень зі швидкістю потоку  $0.8\text{ мл/хв}$ . Аналіз проведений з чистими кристалами ментолу для відпрацювання методики, а потім використаний для аналізу листя м'яти, гарячого чаю, чаю кімнатної температури та рідкого екстракту з чаю [116].

Метод ГХ-МС та ГХ-ПД використаний для контролю якості складу ефірної олії м'яти, вирощеної в Словаччині. В аналізі використана капілярна колонка  $50\text{ м}\times 0.25\text{ мм}$  [151]. Методом ГХ-ПД порівняний склад ефірної олії м'яти, яка вирощена в різних географічних регіонах. Дослідження проводились на колонці  $50\text{ м}\times 0.20\text{ мм}$  зі split-співвідношенням 1:150 та газом-носієм гелієм [125].

Для визначення вмісту ефірної олії м'яти в листі молоді та старої рослини запропонований метод ГХ-ПД з використанням кремнієвої капілярної колонки  $30\text{ м}\times 0.25\text{ мм}$  зі split-співвідношенням 1:20. Температура детектору склала  $280^{\circ}\text{C}$ , газ-носієм гелій зі швидкістю потоку  $1\text{ мл/хв}$  [131]. Запропонований також метод ГХ з капілярною колонкою  $25\text{ м}\times 0.25\text{ мм}$ , з температурною програмою від  $50$  до  $180^{\circ}\text{C}$  та газом-носієм гелієм [96], який дозволяє протягом 32 хвилин розділити п'ять похідних ментолу в ефірній олії м'яти.

Метод ГХ-ПД запропонований для аналізу летких сполук ефірної олії м'яти та апельсину. Серед основних компонентів олії м'яти були ідентифіковані ізомери ментолу. Аналіз проведений з використанням капілярної колонки 50 м×0.2 мм, газу-носію гелію зі швидкістю потоку 1,3-1,5 мл/хв. Методика була з успіхом застосована для аналізу кількісного складу олії м'яти в листях, жувальній гумці, чаї та солодошах [124].

Крім цього, методи ГХ-МС та ГХ-ПД використовують для ідентифікації та кількісного визначення ментолу в багатьох лікарських препаратах, випущених в різних ЛФ.

ГХ-МС метод запропонований для аналізу бальзаму Tiger Balm (містить суміш летких компонентів ефірних олій), який використовується для лікування м'язових і головних болей [50] та для визначення ментолу в складі трьох традиційних китайських рослин і апробований в аналізі протизастудного засобу, до складу якого вони входять [54]. В першому випадку проведено порівняння двох методів: ГХ-МС і ГХ-МС в поєднанні з методом термальної десорбції. Доведено, що останній метод є більш ефективним. При аналізі препарату рекомендовано використовувати камфору і ментол як хімічні маркери [50]. В другому випадку для проведення аналізу леткі компоненти після дистиляції були зібрані до етилового етеру. Дослідження проводились з використанням колонки HP-5 MS. В процесі аналізу використаний метод стандартних добавок [54].

Метод ГХ-ПД розроблений для кількісного визначення ментолу в мазі з метилсаліцилатом і маслом насіння льону [56], мазі з метилсаліцилатом [114], таблетках Валідол [160], супозиторіях [98], пастильках з бензокаїном та тиротрицином [77], сиропі від кашлю [109], мазі Dologex зі скипидаром, камфорою та метилсаліцилатом [144], льодяниках "Травісил" [2], кремі і гелі для місцевого застосування з метилсаліцилатом [150]. Для вилучення ментолу з досліджуваних ЛФ використовувались різноманітні розчинники. Екстракцію компонентів мазі з ментолом, метилсаліцилатом та маслом насіння льону проводили метанольним розчином калію гідроксиду з використанням магнітної мішалки з наступним додаванням винної кислоти та центрифугуванням розчину

[56]; екстракцію речовин з ланоліново-вазелинової мажевої основи проводили нагріванням наважки мазі з метанолом з використанням зворотнього холодильника [114]; вилучення ментолу з супозиторної маси проводили тетрагідрофураном з використанням мішалки [98]; екстракцію ментолу з водних розчинів льодяників “Травісил” проводили гексаном [2].

Найчастіше кількісне визначення ментолу проводять з використанням внутрішнього стандарту. Для аналізу мазі з ментолом, метилсаліцилатом та маслом насіння льону використаний терпінгідрат як внутрішній стандарт [56]; для аналізу мазі з ментолом та метилсаліцилатом – камфора [114]; при визначенні ментолу в складі супозиторіїв – тимол [98]; в процесі аналізу мазі Dologex – евкالیптол [144]; льодяників “Травісил” – крезол [2]; для кількісного визначення ментолу і метилсаліцилату в кремні та гелі для місцевого застосування – анетол [150].

Всі розроблені методики характеризуються різними діапазонами застосування та валідаційними характеристиками (табл. 1.1). В більшості випадків для кількісного визначення ментолу використовується колонка довжиною 30 м [2, 56, 109, 114, 150, 160].

Таблиця 1.1

### Характеристика методик кількісного визначення ментолу в складі ЛФ

Концентрацій- ний діапазон	Характеристики лінійності	МВ та МКВ	колонка	RSD, %
2000-6000 мг/мл	$Y=1177.6X-496507$ $r=0.999$	МВ=194.58 мг/мл МКВ=589.64 мг/мл	30 м×0.53 мм×3.0 μм	1.66 [56]
-	$r=0.97667$	МВ=0.1 нг/мл МКВ=0.25 нг/мл	30 м×0.25 мм×0.2 μм	[114]
0.448-2.240 мг/мл	$Y=0.65886X-$ 0.00685 $r=0.9978$	-	30 м×0.53 мм×1.0 μм	2.09 [160]

0.48-0.72 мг/мл	$Y=0.9775X-0.0112$ $r=0.9998$	МВ=0.01 мг/мл МКВ=0.03 мг/мл	60 м×1.8 μм	0.9 [98]
90-120 %	-	-	30 м×0.32 мм×1.0 μм	1.8 [109]
-	$r=0.99996$	МВ=0.003 мг/мл МКВ=0.001 мг/мл	30 м×0.32 мм×0.25 μм	0.04 [2]
1.0 мг/мл-3.0 мг/мл	$r=0.9998$	-	30 м×0.53 мм×3.0 μм	0.51 [150]

Як газ носій найчастіше в аналізі використовується азот [56, 109, 114, 160] або гелій [2, 98, 150]. Швидкість потоку також є різною: 1 мл/хв [114], 7.0 мл/хв [160], 5 мл/хв [98], 2 мл/хв [2, 150]. Також для аналізу різних ЛФ використовують різні split-співвідношення (1:3 [160], 1:50 [98]).

Існують методи ГХ-ПІД для визначення ментолу в інших продуктах. Метод ГХ-ПІД запропонований для аналізу впливу на якість йогурту можливості поглинання ментолу поліетиленовою упаковкою. Дослідження проводили на колонці 30 м×0.22 мм з використанням режиму splitless протягом 1 хвилини. Ментол вилучали ацетоном [83].

Метод ГХ-ПІД запропонований для визначення ментолу в меді та бджолиному воску. Виділення ментолу проводили трьома способами: екстракція рідина-рідина метиленхлоридом, дистиляція або ТФЕ з використанням октадецилкремнієвих картриджів. Для розділення використовували колонку 60 м×0.53 мм [93].

Метод ГХ-ПІД розроблений для точного визначення кількісного вмісту ментолу в цигарках. В аналізі використана колонка 30 м×0.25 мм×0.25 μм, газ-носій гелій та швидкість потоку 1.1 мл/хв [74]. Розроблений метод кількісного визначення ментолу в зразках сечі курців цигарок з вмістом ментолу та без. В процесі аналізу використовували ТФМЕ для відбору, концентрування та автоматизації аналізу. Визначення проводили методом ГХ-МС з використанням

стійкого ізомеру ментолу як внутрішнього стандарту. В аналізі використана колонка 30 м×0.25 мм, газ-носії гелій та швидкість потоку 1 мл/хв [133].

Метод РХ з флуориметричним детектором запропонований для одночасного визначення тиротрицину, бензокаїну і ментолу. Дослідження проводили ізократичним елююванням з лужною рухомою фазою (рН=8,2) [47].

Запропонований метод РХ для кількісного визначення двох ізомерів ментолу після дериватизації напроксен ацилхлоридом в толуолі. Розділення проводили на колонці С8 з рухомою фазою метанол-вода-тетрагідрофуран (80:18:2). Метод використаний для визначення ментолу в листях м'яти після екстракції толуолом і показав гарні результати [85].

Запропонований метод ВЕРХ з поляризованим фотометричним детектором для кількісного визначення ментолу. Для збільшення чутливості методу використаний комплект спліт-комірок. Чутливість методу склала 0,5 мкг [75]. В іншому методі ВЕРХ (з визначенням показника заломлення) використана колонка 4.6 мм×250 мм×5 μм та води:метанолу (30:70 v/v) як рухомої фази зі швидкістю потоку 1.0 мл/хв [142]. Метод успішно використаний для кількісного визначення ментолу в сиропі.

Запропонований метод кількісного визначення ментолу методом спектрофотометрії після його реакції з саліциловим альдегідом в середовищі концентрованої сірчаної кислоти. Продукт реакції має червоно-помаранчеве забарвлення та характеризується максимумом поглинання при 510 нм. Метод апробований на зеленому чаї з м'яти і показав гарні результати відтворюваності [80]. Застосований також метод раманівської спектроскопії з використанням методу часткових найменших квадратів для кількісного аналізу мазі з метилсаліцилатом та ментолом [119].

## Резюме

Проведений огляд літературних джерел показав, що часто в екстемпоральному виготовленні багатьох країн зустрічаються МЛФ, які

використовуються в лікуванні різноманітних дерматологічних захворювань. На сьогоднішній день вимоги до контролю якості таких ЛФ описані в другому виданні ДФУ у вигляді статті “М’які лікарські засоби, виготовлені в аптеках”. Звичайно ж, основною вимогою до їх контролю якості є кількісне визначення. Крім цього, сучасні валідовані методики необхідні для вивчення стабільності ЛФ.

Аналіз літературних джерел стосовно методик контролю якості сировини, настоек та ефірних олій календули і евкаліпту показав, що з цією метою використовують методи ГХ. Найчастіше серед них зустрічається метод ГХ-МС, який дозволяє ідентифікувати більшість їх компонентів.

Серед описаних в літературних джерелах методів контролю якості лікарських препаратів з ментолом найчастіше для визначення його кількісного вмісту рекомендують метод ГХ-ПД.

З огляду на проведений аналіз, для контролю якості та вивчення стабільності мазей з настоянками календули, евкаліпту та ментолом актуальною є розробка методик їх ідентифікації та кількісного визначення різними методами газової хроматографії.

## РОЗДІЛ 2

### ХАРАКТЕРИСТИКА ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МЕТОДІВ АНАЛІЗУ

2.1 Аналіз препаратів промислового виробництва з евкаліптом, календулою та ментолом. Обґрунтування та вибір об'єктів дослідження

Одним із напрямків лікування дерматологічних захворювань є використання МЛФ, до складу яких входять екстракти або настойки з ЛРС. Поряд з ЛЗ синтетичного походження вони займають значне місце на ринку України. Їх перевагою є можливість тривалого використання без розвитку серйозних побічних ефектів, що є позитивним в лікуванні дерматологічних захворювань. Аналіз групи D “Дерматологічні засоби” за довідником Компендіум-онлайн (за класифікаційною системою АТС) [18] показав, що в складі таких препаратів зустрічаються ЛЗ з екстрактами чи настойками календули, живокосту, прополісу, ромашки та ін. Найбільше препаратів рослинного походження зустрічається в підгрупі D03 “Засоби для лікування ран та виразкових уражень” групи D. Дана група складається з двох підгруп D03A “Препарати, що сприяють загоєнню (рубцюванню) ран”, до якої входить група D03A X “Різні препарати, що сприяють загоєнню” (59 препаратів) та D03B “Ферменти”, до якої входить група D03B A “Протеолітичні ферменти” (2 препарати). До групи D03A входить вісім підгруп, серед яких підгрупа D03A X18 “Препарати нагідок (календули)”, D03A X19 “Препарати живокосту” та D03A X21 “Прополіс” складають разом третю частину від всього обсягу (33,89 %). Всі ЛЗ в даних підгрупах вітчизняного виробництва. Крім цього, препарати рослинного походження входять до складу підгрупи D03A X50 “Інші препарати, включаючи комбінації”. Велика кількість ЛФ, які містять екстракти з квіток календули входять до групи R02A A20 “Препарати, що застосовуються у разі захворювань горла. Різні антисептики”. До її складу також входять препарати з екстрактами та ефірною олією евкаліпту. Вони зустрічаються в складі препаратів групи M02A “Засоби, що



застосовуються місцево у разі суглобового або м'язового болю” та R05X “Інші препарати, що застосовуються у разі кашлю та застудних захворювань”.

Ментол також зустрічається в декількох групах: R02A A20 “Препарати, що застосовуються у разі захворювань горла. Різні антисептики”; R05X “Інші препарати, що застосовуються у разі кашлю та застудних захворювань”; M02A “Засоби, що застосовуються місцево у разі суглобового або м'язового болю”. Проведений аналіз показує, що часто екстракти з календули а евкалипту, а також ментол поєднують в різноманітних ЛФ, що дозволяє доповнити їх дію.

За даними Компендіуму-онлайн [18] були обрані препарати, які містять в своєму складі ментол, евкалипт та календулу у вигляді рослинної сировини, ефірної олії, настойки та екстрактів. Наступним етапом став вибір лише зареєстрованих лікарських засобів на момент проведення досліджень (станом на травень 2018 року) за Державним реєстром лікарських засобів України [10].

Проведений аналіз показав, що ЛФ, до яких входять дані компоненти характеризуються великим розмаїттям: різні м'які ЛФ (більшість у формі мазей); настойки; розчини та краплі для внутрішнього застосування; таблетки і льодяники; збори та ЛРС (квіти) і ін. Асортимент готових ЛЗ з екстрактами з квіток календули, дозволених на сьогоднішній день до застосування в Україні складає 60 препаратів (рис. 2.1). Більшість препаратів – препарати вітчизняного виробництва (90 %), вироблені на чотирнадцяти підприємствах. Зарубіжні виробники представлені трьома країнами: Індія (1 виробник, мазь), Польща (1 виробник, супозиторії) і Єгипет (4 виробники, квіти календули) та складають 10 % від усіх препаратів, які містять календулу, а також зареєстровані на ринку України.

Екстракти і ефірна олія евкалипту також входить до складу препаратів, представлених 19 ЛФ, крім того, на ринку зареєстровані лікарська рослинна сировина та збори, до складу яких вона входить (рис. 2.2). На фармацевтичному ринку загалом зареєстровано 91 препарат, із яких 29 – зарубіжного виробництва (31,87 %).

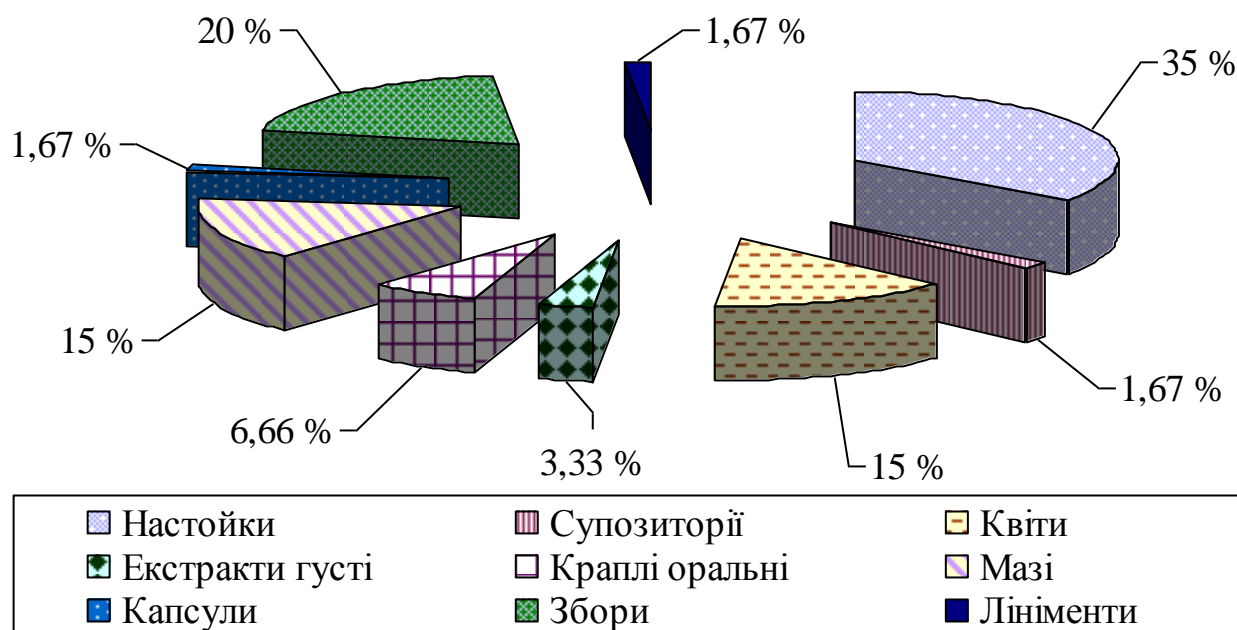


Рис. 2.1 Структура розподілу препаратів з календулою за характером ЛФ

Серед зарубіжних виробників є одинадцять країн: Німеччина (мазь, 3 ЛЗ; капсули, наскірня емульсія по 1 ЛЗ та ефірні олії – 2 ЛЗ); Велика Британія (крем і льодяники по 1 ЛЗ); Індія (мазі – 3 ЛЗ, 2 форми випуску ЛРС (листя)); В'єтнам (бальзам – 3 ЛЗ); Словацька Республіка (мазь, краплі назальні по 1 ЛЗ); Швейцарія (мазь, 1 ЛЗ); Нідерланди (таблетки і сироп – по 1 ЛЗ); Пакистан (гранули, 2 ЛЗ); Китай (екстракт густий – 1 ЛЗ); Чеська Республіка (краплі оральні – 2 ЛЗ); Грузія (ЛРС (листя), 2 ЛФ).

Таблиця 2.1

### Структура розподілу препаратів з евкалиптом за характером ЛФ

<i>Назва лікарської форми</i>	<i>Відсотковий вміст від загальної кількості препаратів</i>
Мазь	16,48
Аерозоль/спрей	15,38
ЛРС (листя)	10,99
Настойка	7,69

Таблетки	5,49
Розчин олійний	5,49
Розчин спиртовий	5,49
Екстракт густий	5,49
Розчин для інгаляцій	4,40
Краплі назальні	3,30
Збір	3,30
Емульсія нашкірна	3,30
Супозиторії	2,20
Гранули	2,20
Краплі оральні	2,20
Лінімент	1,10
Крем	1,10
Бальзам	1,10
Капсули	1,10
Сироп	1,10
Льодяники	1,10

Незважаючи на наявність багатьох ЛФ з календулою та евкаліптом, настойки з них входять до складу багатьох препаратів аптечного виготовлення. Серед них зустрічаються розчини для зовнішнього застосування для лікування вугрів, лосьйони для догляду за сухим волоссям, нанесення на шкіру голови та лікування себорейного дерматиту, мазі для лікування дерматиту. Про це свідчить аналіз рецептури аптек Волинської, Хмельницької, Харківської, Сумської та Житомирської областей. В багатьох препаратах настойки поєднують між собою для посилення дії препарату:

Rp.: Zinci oxydi

Ung. Naphthalani ana 5,0

Rp.: Sp. camphorati 15 ml

Tinct. Calendulae 15 ml

Tinct. Convallariae	Aq. purificatae 50 ml
Tinct. Calendulae ana 5 ml	M. D. S.
M. D. S.	
Rp.: Aethanoli ad 100 ml	Rp.: Tinct. Calendulae 30 ml
Tinct. Capsici 8 ml	Tinct. Capsici 20 ml
Tinct. Eucalypti 8 ml	Tinct. Hyperici 30 ml
Olei Rusci 10,0	M. D. S.
M. D. S.	
Rp.: Aethanoli 70 %-50 ml	Rp.: Laevomycetini 2,0
Sol. Acidi borici 2 %-50 ml	Sol. Acidi borici 2 %-25 ml
Spiritus camphorati 20 ml	Sol. Synoestrolis 2 % oleosae 2,0
Tinct. Calendulae 20 ml	Tinct. Eucalypti 25 ml
Laevomycetini 5,0	Tinct. Calendulae 50 ml
Acidi salicylici 1,5	M. D. S.
M. D. S.	
Rp.: Aethanoli 70 %-50 ml	
Tinct. Capsici 20 ml	
Tinct. Eucalypti 10 ml	
Tinct. Calendulae 10 ml	
M. D. S.	

Прописи ЛФ можуть доповнюватись різноманітними компонентами в залежності від спрямованості дії препарату, однак, є ЛФ, які готуються часто в багатьох аптеках різних областей України. Найчастіше це однокомпонентна мазь з настойкою евкالیпту та мазь, яка містить обидві настойки. На ринку готових ЛЗ такі препарати не мають аналогів, оскільки ліків такого складу промислового виробництва немає. Оскільки мазі часто зустрічаються в практиці аптек вони були обрані як об'єкти для подальших досліджень.

**Виготовлення мазі з настойкою евкالیпту:** в ступку відміряють 2.5 мл настойки евкالیпту, емульгують 1.25 г безводного ланоліну та частинами додають 21.25 г вазеліну. Перемішують до однорідності.

**Мазь № 1****Rp.: Tinct. Eucalypti 2,5 ml****Lanolini 1,25****Vaselini 21,25****M. D. S.****Мазь № 2****Rp.: Tinct. Calendulae 5 ml****Tinct. Eucalypti 5 ml****Dimexidi 2,5 ml****Ol. Vaselini 12,5****Lanolini 12,5****M. D. S.**

**Виготовлення мазі з настойкою календули і евкаліпту:** в ступку відміряють по 5 мл настоек календули та евкаліпту, додають 2.5 мл димексиду та 12.5 г масла вазелінового. Перемішують до однорідності. Додають частинами 12.5 г ланоліну безводного, перемішують до однорідності.

Ментол також є компонентом багатьох ЛФ. 45,74 % препаратів з ментолом, зареєстрованих на фармацевтичному ринку України вироблені зарубіжними виробниками, решта – вітчизняними. На рисунку 2.2 наведено структуру розподілу препаратів з ментолом за характером ЛФ. До твердих ЛФ віднесені таблетки, льодяники, капсули; до МЛФ – мазі, креми, бальзами, лініменти та гелі. Отримані дані свідчать, що тверді ЛФ складають найбільшу частину від усього об'єму препаратів з ментолом – 28,72 %; друге місце займають МЛФ – 26,60 %, третє – розчини на шкірні 11,70 %. Льодяники, до яких входить ментол та його субстанція, зареєстровані на ринку України, виготовлені на зарубіжних підприємствах в Німеччині та Індії. Всі препарати в аерозольних упаковках, супозиторії, капсули, таблетовані ЛФ та краплі оральні – на вітчизняних підприємствах.

Ментол входить до складу різноманітних за складом розчинів для нашкольного застосування та мазей, які використовуються для лікування багатьох видів дерматиту. Їх рецептура також відрізняється за вмістом активних речовин в різних областях України. Нижче наведені прописи, які часто зустрічаються в рецептурі виробничих аптек різних областей.

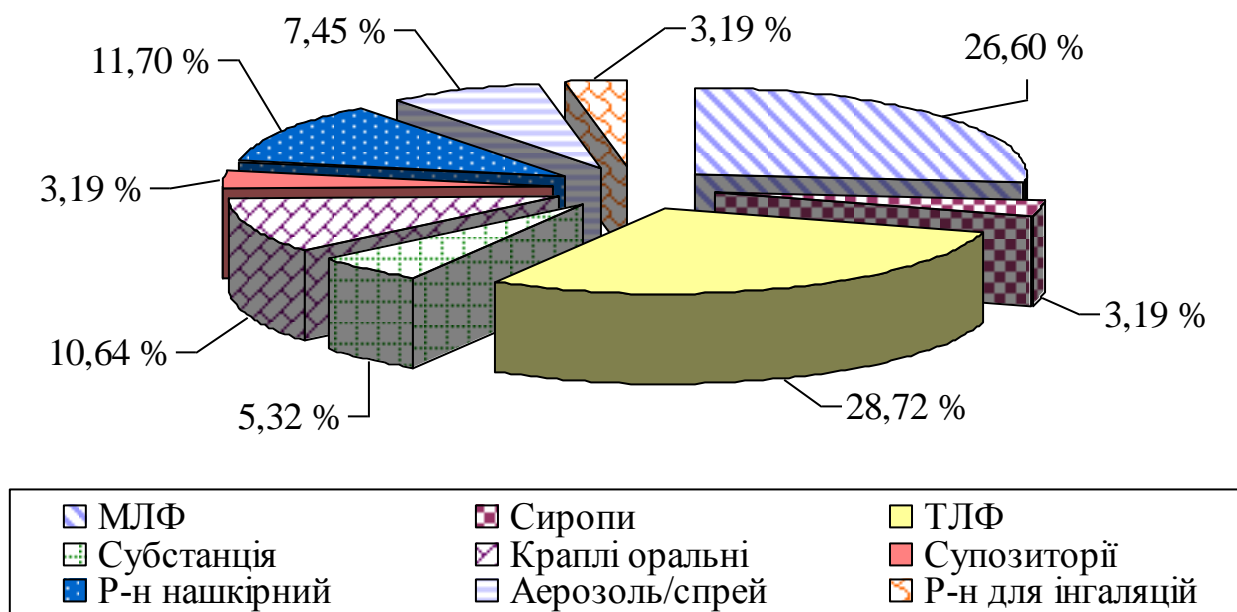


Рис. 2.2 Структура розподілу препаратів з ментолом за характером ЛФ

Rp.: Mentholi 0,5

Acidi borici 5,0

Vaselini 94,5

M. D. S.

Rp.: Aethanoli 96 %-50 ml

Benzocaini 0,2

Mentholi 0,2

Aq. purificatae ad 300 ml

M. D. S.

Rp.: Mentholi 1,0

Resorcini 2,5

Ac. salicylici 2,5

Sulfuris 5,0

Olei Ricini 5,0

Lanolini 25,0

Vaselini 25,0

M. D. S.

Rp.: Ac. salicylici 3,0

Resorcini 2,0

Mentholi 0,5

Olei Ricini 10,0

Aethanoli 80 % ad 100 ml

M. D. S.

Rp.: Mentholi 0,05

Anaesthesini 0,5

Sp. aethylici 70 %-10 ml

Ac. borici 3,0

Rp.: Sp. aethylici 70 %-50 ml

Mentholi 3,0

Anaesthesini 3,0

Glycerini 20,0

Sol. Dimedroli in amp. № 10

Lanolini 50,0

Vaselini 50,0

M. D. S.

Zinci oxydi 30,0

Talci 30,0

Amyli 30,0

Aq. purificatae 90 ml

M. D. S.

Rp.: Mentholi 1,0

Sp. aethylici 70 %-10 ml

Ac. borici 3,0

Sol. Dimedroli 1 %-5 ml

Vaselini 100,0

M. D. S.

Найчастіше в практиці виробничих аптек зустрічається мазь Симановського, яка готується про запас та з успіхом використовується для лікування верхніх дихальних шляхів. З огляду на це є необхідність розробки методик контролю якості її компонентів згідно вимог ДФУ, тому мазь також була обрана для подальших досліджень.

### Мазь № 3

**Rp.: Mesatoni 0,02**

**Mentholi 0,04**

**Zinci oxydi 0,24**

**Lanolini 4,0**

**Vaselini 6,0**

**M. D. S.**

**Виготовлення:** відважують 0,24 г цинку оксиду, вміщують у ступку і подрібнюють з 2 краплями вазелінового масла. Відважують 6,00 г вазеліну, додають невелику кількість вазеліну в ступку, перемішують з цинку оксидом і відсувають на стінку ступки. Відважують 0,04 г ментолу, вміщують в ступку, розчиняють в 1 краплі вазелінового масла, змішують з невеликою кількістю вазеліну відсувають на стінку ступки. Відважують 0,02 г фенілефрину гідрохлориду, розчиняють в ступці в 2-3 краплях води очищеної, відважують

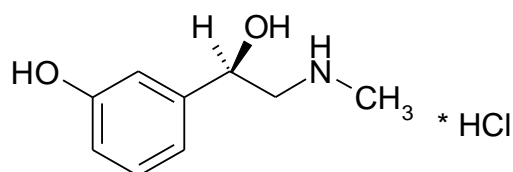
4,00 г ланоліну, вміщують в ступку і емульгують розчин в ступці. Змішують з маззю, яка знаходиться на стінці ступки, додають вазелін, що залишився і перемішують до однорідності.

Для приготування мазей з настоянками використовували такі компоненти: настоянка календули (виробник ПАТ “Фітофарм”, Україна, серій 30416 та 211216), настоянка евкалипту (виробник ПАТ “Фітофарм”, Україна, серій 81115 та 41016), вазелінове масло (виробник Sasol Wax GmbH, Німеччина, серія 0000022579), ланолін безводний (виробник Imperial-Oel-Import, Німеччина, серія 4039), вазелін білий (виробник Sasol Wax GmbH, Німеччина, серія 0000021029) та диметилсульфоксид. В кількісному визначенні мазей з настоянкою евкалипту використовували стандартний зразок *1,8-цинеолу* виробництва Alfa Aesar (ThermoFisher (Kandel) GmbH), Німеччина, серія 10191769 з кількісним вмістом 99 %.

*Диметилсульфоксид (Dimethyl sulfoxide)*, *M. m.* 78.1;  $C_2H_6OS$  – безбарвна рідина, змішується з водою Р і етанолом (96 %) Р. Для досліджень використовували субстанцію виробництва Gailord Chemical Company LLS, США, серія PHS130916.

Для приготування мазі Симановського використовували субстанції фенілефрину гідрохлориду, цинку оксиду, ментолу, ланоліну (виробник Leko Pharm, Китай, серія 4327) та вазеліну (виробник Panama Petrochem LTD, Індія, серія АЕ-24/2016-17).

*Фенілефрину гідрохлорид (2.1) (Phenylephrine hydrochloride)*, *M. m.* 203,7;  $C_9H_{14}ClNO_2$  – кристалічний порошок білого або майже білого кольору, легко розчинний у воді Р і етанолі (96 %) Р. В роботі використана субстанція виробництва Unichem Laboratories LTD, Індія, серія PPHLP60001, кількісний вміст фенілефрину гідрохлориду в субстанції 100.30 %.

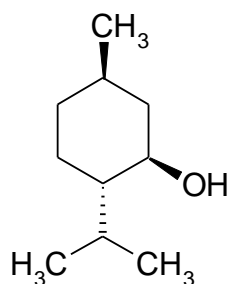


(2.1)



*Цинку оксид (Zinc oxide), M. m. 81,4; ZnO* – м'який аморфний порошок білого або злегка жовтувато-білого кольору, вільний від піщаних частинок, практично не розчинний у воді Р та етанолі (96 %) Р. Розчиняється в розведених мінеральних кислотах. В дослідженнях використовували субстанцію виробництва Zinsa, Перу, серія L08131014, кількісний вміст цинку оксиду в субстанції 99.63 %.

*Ментол (2.2) (Menthol), M. m. 156.3; C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O* – голчасті безбарвні блискучі кристали. В роботі використовувались субстанції ментолу виробництва Kaizen Organics PVT.LTD, Індія, серія SI/FP/1825/09-10 та Bhagat Aromatics Limited, Індія, серія BAL/MMB/08115/225.



(2.2)

Для проведення хроматографічних досліджень та виділення компонентів з мажевої основи використовували органічні розчинники: метанол, хлороформ, гексан.

*Метанол (Methanol), M. m. 32.04; CH<sub>3</sub>OH* – CHROMASOLV, для ВЕРХ,  $\geq 99,9$  %. Виробник Honeywell, Riedel-de Haen, серія STBG5353V.

*Хлороформ (Chloroform), M. m. 119.38; CHCl<sub>3</sub>* – для ГХ, вміст активної речовини 99,0-99,4 %. Виробник Sigma-Aldrich, серія STBF9113V.

*Гексан (Hexane), M. m. 86.18; C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>* – CHROMASOLV, для ВЕРХ,  $\geq 95$  %. Виробник Sigma-Aldrich, серія STBF6864V.

## 2.2 Характеристика методів дослідження

З огляду на основні вимоги, наведені в статті “М’які лікарські засоби, виготовлені в аптеках” [9, 28] для дослідження стабільності обраних мазей використані параметри опис та кількісне визначення. Оцінювали зовнішній вигляд мазі, її колір, запах та однорідність. Для всіх діючих компонентів мазей

були обрані і верифіковані, або розроблені та валідовані сучасні методики кількісного визначення.

Досліджувані мазі аптечного виготовлення призначені для нашкірного застосування (мазь з настояюкою евкалипту і мазь з настоянками календули та евкалипту) та назального застосування (мазь Симановського). Тому, окрім статті “М’які лікарські засоби, виготовлені в аптеках” вони повинні відповідати вимогам загальних статей “М’які ЛЗ для нашкірного застосування” та “Назальні ЛЗ”. Одною із вимог до якості екстемпоральних мазей є вимога до їх мікробіологічної чистоти, яка згадана в декількох статтях. Згідно з вимогами статті “Нестерильні ЛЗ, виготовлені в аптеках” ДФУ [9] при виготовленні, пакуванні та зберіганні нестерильних м’яких ЛЗ аптечного виготовлення повинні бути вжиті заходи, які б забезпечили їх мікробіологічну чистоту. Аналогічні вимоги містять загальні статті “М’які ЛЗ для нашкірного застосування” та “Назальні ЛЗ” ДФУ [8]. Щодо вимог до мікробіологічної чистоти в усіх статтях вимоги однакові: мазі аптечного виготовлення повинні відповідати вимогам щодо мікробіологічної чистоти (стаття 5.1.4. “Мікробіологічна чистота нестерильних ЛЗ та субстанцій для фармацевтичного застосування” ДФУ). Крім цього, згідно з вимогами статті “М’які лікарські засоби для нашкірного застосування” при виробництві мазей повинні бути вжиті заходи, що забезпечують відповідність встановленим реологічним параметрам [8]. Даним вимогам повинні відповідати і назальні м’які ЛЗ. Тому в процесі дослідження мазей була визначена їх мікробіологічна чистота та оцінені структурно-механічні властивості. Дані параметри також характеризують стабільність мазей. З огляду на це було вирішено оцінити їх в процесі зберігання ЛФ для визначення їх стійкості та відповідності вимогам.

### 2.2.1 Методики кількісного визначення компонентів мазей

При проведенні досліджень використовували мірний посуд класу А, реактиви, які відповідають вимогам ДФУ, ваги AXIS ANG 200 (Польща) та Shimadzu Uni Bloc AUW 120D (Японія), для пробопідготовки при проведенні

кількісного визначення ментолу використовувалась ультразвукова баня Ultrasonic Cleaner Set (Wise Clean WUC-A06H).

На сьогоднішній день в літературі не описані методики ідентифікації та кількісного визначення мазей з настоянками календули та евкаліпту аптечного виготовлення. Що стосується мазі Симановського, описані методики використовувались ще в СРСР. В літературі зустрічаються методики кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду титруванням методом аргентометрії [21], броматометрії [21, 23] та йодхлорометрії [23]. Крім цього, є рекомендації по проведенню його визначення методом спектрофотометрії [23]. За існуючими рекомендаціями цинку оксид визначали методом комплексонометрії, однак з використанням інших реактивів (як індикатор рекомендований кислотний хром чорний) [21]. За рекомендаціями ДФУ для кількісного визначення використовують індикаторну суміш ксиленолового оранжевого. За сучасними вимогами такі методики не можуть бути використані в аналізі, оскільки у Фармакопеї СРСР не існували вимоги до проведення валідації методик, яка зараз є обов'язковою. Крім цього, кількісне визначення ментолу в екстемпоральних ЛФ не проводились, існують рекомендації з проведення лише його ідентифікації.

Кількісне визначення методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області проводили на спектрофотометрі Thermo Fisher Evolution 60S (USA) на базі кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету. Дослідження методами ПФА та ГХ-МС проводили на газовому хроматографі GCMS-QP2010 Ultra Shimadzu з автосемплером AOC 5000 Plus і колонкою Rxi-5MS (30,0 м×0,25 мм×0,25 μм). Для розшифрування отриманих спектрів використовували бібліотеку NIST (National Institute of Standards and Technology, США). Дослідження методом ГХ-ПІД проводили на газовому хроматографі GC-2010 Plus Shimadzu з полуменево-іонізаційним детектором, автосемплером AOC-20i+s та колонкою Rxi-5MS (30,0 м×0,25 мм×0,25 μм). Всі дослідження методами ГХ проводили на базі кафедри аналітичної та токсикологічної хімії Литовського університету наук здоров'я під керівництвом зав. кафедри, проф. Л. Іванаускаса.

## 2.2.2 Випробування мікробіологічної чистоти мазей

Критерії прийнятності мікробіологічної чистоти нестерильних ЛЗ наведені в статті 5.1.4. “Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів та субстанцій для фармацевтичного застосування”. До всіх досліджуваних мазей стаття 5.1.4. висуває однакові критерії прийнятності: загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) – не більше  $10^2$  КУО/г або КУО/мл, загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТҮМС) – не більше  $10^1$  КУО/г або КУО/мл. Щодо вимог до наявності окремих видів мікроорганізмів – в 1 грамі або 1 мл випробуваного зразку повинні бути відсутні бактерії *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*. Оскільки мазь Симановського наноситься на слизову оболонку носа, вирішено було в процесі досліджень мікробіологічної чистоти визначити наявність в мазі бактерій *Escherichia coli*.

Випробування мікробіологічної чистоти проводили за вимогами статті 2.6.12. “Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів: визначення числа мікроорганізмів” та 2.6.13. “Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів: випробування на окремі види мікроорганізмів” (відповідно до рекомендацій статті 5.1.4).

За вимогами статті 2.6.12. випробування повинні проводитись у умовах, які забезпечують захист від стороннього мікробного забруднення лікарського препарату. Тому всі дослідження були проведені в суворих асептичних умовах з використанням ламінарного боксу (кабінет біологічної безпеки AC2-4E1 “Esco”, Індонезія). При проведенні досліджень зразки мазей зберігали за температури  $5 \pm 3$  °C. Проводили випробування свіжовиготовлених зразків мазей та через 10, 20, 30 днів зберігання. Дослідження проводились на кафедрі біотехнології Національного фармацевтичного університету під керівництвом проф. Стрілець О. П.

При проведенні досліджень використовували щільні та рідкі живильні середовища відповідно до рекомендацій статей 2.6.12. та 2.6.13. ДФУ [8]: соєво-казеїновий агар (при визначенні кількості живих бактерій), Сабуро-декстрозний

агар (при визначенні кількості грибів), соєво-казеїновий бульйон (для попереднього інкубування при визначенні наявності певних видів мікроорганізмів). При перевірці ростових та інгібіторних властивостей живильних середовищ використовували манітно-сольовий агар (випробування на ростові та індикативні властивості *Staphylococcus aureus*), цетримідний агар (випробування на ростові та індикативні властивості *Pseudomonas aeruginosa*) та агар Мак-Конки (випробування на ростові та індикативні властивості *Escherichia coli*) за рекомендаціями статті 2.6.13. ДФУ [8]. Критерієм оцінки мікробіологічної чистоти за трьома перерахованими видами мікроорганізмів є повна відсутність їх зростання на відповідному живильному середовищі при проведенні досліджень або негативна ідентифікація у випадку появи будь-якого зростання у чашках Петрі.

Для доведення можливості використання методу визначення мікробіологічної чистоти проводили визначення числа мікроорганізмів в зразку мазі та порівнювали отримане значення з числом мікроорганізмів в контрольному досліді. Для перевірки придатності методик визначення загального числа життєздатних аеробних мікроорганізмів і грибів були використані тест-штами мікроорганізмів з американської колекції культур (АТСС): *Staphylococcus aureus* АТСС 6538, *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 9027, *Bacillus subtilis* АТСС 6633, *Candida albicans* АТСС 10231, *Aspergillus brasiliensis* АТСС 16404. Підготовку тест-мікроорганізмів проводили за рекомендаціями статті 2.9.12. Тест-штами бактерій та грибів вирощували на відповідних живильних середовищах кожен окремо. Бактерії *St. aureus*, *Ps. aeruginosa* та *Bacillus subtilis* вирощували на соєво-казеїновому бульйоні при температурі 30-35 °С від 18 до 24 годин (за рекомендаціями статті 2.6.13 ДФУ). Гриби *Candida albicans* та *Aspergillus brasiliensis* вирощували на поверхні Сабуро-декстрозного агару при температурі 20-25 °С. Культуру грибів *Candida albicans* вирощували протягом 2 діб, а *Aspergillus brasiliensis* – протягом 5 діб (за рекомендаціями статті 2.6.13 ДФУ).

За рекомендаціями ДФУ [8] робочі суспензії тест-мікроорганізмів готували з використанням буферного розчину з натрію хлоридом та пептоном (рН 7.0)

методом послідовних кратних розведень до навантаження близько 100 КУО/мл для кожного тест-мікроорганізму.

Для контролю відсутності впливу розчинників та інших допоміжних речовин на результати випробування проводили негативний контрольний дослід з використанням розчинника замість випробуваного зразка.

Приготування зразків мазей для дослідження здійснювали за пунктом 4-5. “Перевірка придатності методики підрахунку у присутності випробуваного лікарського засобу” [8], яке ґрунтується на фізичних властивостях досліджуваного препарату. Мазі відносяться до групи препаратів, які містять жири, тому для їх розчинення використовували мінімально необхідну кількість стерильного полісорбату-80 до отримання емульсії. Отриману суміш гомогенізували, нагріваючи суміш до 40 °С на водяній бані. Дослідження проводили зі зразками мазі по 10.0 г. Після отримання емульсії до неї додавали буферний розчин з натрію хлоридом і пептоном (рН 7.0 як і у випадку приготування тест-штамів), попередньо підігрітих до температури не вище 40 °С та доводили об’єм до 100 мл для отримання розведення лікарського засобу 1:10. Дане розведення використовували для посівів.

Дослідження придатності методики проводили за рекомендаціями пункту 4-5-4-2. “Метод висівання на чашки” статті 2.6.12. В роботі використовували дві чашки Петрі для кожного тест-мікроорганізму, інкубацію посівів проводили відповідно до вимог ДФУ, підраховували число колоній тест-мікроорганізмів на чашках Петрі, після чого визначали середнє арифметичне значення числа колоній.

Під час досліджень використовували по 5 чашок Петрі з кожним живильним середовищем, кінцевий результат визначали як середнє арифметичне значення числа колоній, які вирости на всіх паралельних чашках.

При визначенні загального числа аеробних мікроорганізмів і грибів методом глибинного висівання брали по 1 мл зразків досліджуваних мазей (у розведенні 1:10), вносили в кожну чашку Петрі діаметром 9 см та додавали 15-20 мл розплавленого соєво-казеїнового або Сабуро-декстрозного агару (температура не вище 45 °С). Загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) визначали на

соєво-казеїновому агарі, а загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) – на Сабуро-декстрозному агарі. Після застигання агарів їх інкубували при температурі 30-35 °С протягом 5 діб (соєво-казеїновий агар), при температурі 20-25 °С протягом 7 діб (Сабуро-декстрозний агар).

При використанні методу двошарового висівання у чашки Петрі діаметром 9 см вносили 15-20 мл соєво-казеїнового або Сабуро-декстрозного агарів з температурою 45-50 °С та давали їм застигнути. По 1 мл підготовлених зразків досліджуваних ЛФ у розведенні 1:10 вносили у стерильні пробірки, які містили по 4 мл відповідного розплавленого та охолодженого (до температури не більше 45 °С) живильного середовища. Вміст пробірки швидко перемішували та переносили в підготовлені чашки Петрі. Швидким її похитуванням розподіляли рівномірно по верхньому шару живильного середовища.

### 2.2.3 Дослідження реологічних характеристик мазі

Реологічні параметри повинні бути однаковими протягом всього терміну зберігання ЛФ, оскільки відображають як лікувальні, так і споживчі властивості препарату [22, 40]. Крім того, одною із найважливіших характеристик мазей є їх консистенція. Вона впливає як на технологічні аспекти виготовлення, так і на їх властивості в процесі застосування (наприклад, простота нанесення, рівномірний розподіл на шкірі, адгезивні властивості), що обумовлює терапевтичний ефект препарату [11, 24, 40, 86]. Консистенція ЛЗ характеризує його здатність протистояти зміні форми та описується сукупністю реологічних параметрів [24, 38, 40]. Крім того, структурно-механічні властивості визначають стійкість в'язко-дисперсних систем [22, 86].

Зручність та легкість нанесення препарату у пацієнта асоціюється з тими зусиллями, які він прикладає для розподілу на поверхні шкіри певної кількості мазі. Даний процес близький до того, який проходить під час зсуву пластично-в'язкого матеріалу в ротаційному віскозиметрі, а зусилля, яке застосовується при нанесенні є напругою зсуву. Вона характеризує спротив матеріалу деформаціям

при визначеній швидкості та може бути змінена в процесі дослідження відповідними налаштуваннями приладу [15, 40].

Тому при вивченні стабільності та контролі якості мазей аптечного виготовлення постає питання встановлення реологічних параметрів та визначення ступеня їх збереження.

В процесі досліджень визначали напругу зсуву зразків мазей ( $\tau$ ), під якою розуміють опір тіла дії прикладеній сили [40] та їх в'язкість ( $\eta$ ), яка характеризує ступінь неньютонівської поведінки матеріалу та стійкість системи до плинну.

Реологічні властивості мазей визначали з використанням ротаційного віскозиметра Rheolab QC (Anton Paar, Австрія) з коаксіальними циліндрами CC27/S-SN29766. Прилад обладнаний програмним забезпеченням RheoPlus/32 V. 3.62 21006422-33024. Він дозволяє виміряти дотикову напругу зсуву ( $\tau$ ) в інтервалі від 0.5 до  $3.0 \times 10^4$  Па, встановити градієнт швидкості зсуву ( $D\dot{\gamma} \times c^{-1}$ ) від 0.1 до 4000  $c^{-1}$  та виміряти в'язкість зразку ( $\eta$ ) в межах  $1-10^6$  Па $\times$ с.

Вивчення реологічних параметрів проводили при температурі  $20 \pm 0.5$  °C. Термостатування зразків здійснювали в термостаті MLM U15 с. Дослідження проводили на кафедрі промислової фармації Національного фармацевтичного університету під керівництвом доц. Кухтенко Г. П.

*Методика вивчення реологічних параметрів:* наважку зразку мазі (близько 17.0 г) поміщали в ємність зовнішнього нерухомого циліндру, встановлювали необхідну температуру досліду, час термостатування – 20 хвилин. Умови досліду встановлювали за допомогою програмного забезпечення.

Вивчення реологічних параметрів мазей проводили в три етапи:

- лінійне збільшення величини швидкості зсуву від  $0,1$   $c^{-1}$  до  $350$   $c^{-1}$  з кількістю точок досліду на кривій плинності зразків 105, тривалість вимірювання в кожній точці кривої 1 секунда;
- затримка швидкості зсуву на значенні  $350$   $c^{-1}$  тривалістю 1 секунда;
- лінійне зменшення величини швидкості зсуву від  $350$   $c^{-1}$  до  $0,1$   $c^{-1}$  з кількістю точок досліду на кривій плинності зразків 105, тривалість вимірювання в кожній точці кривої 1 секунда.



В процесі досліджень були визначені величини граничної напруги зсуву та структурної в'язкості з використанням моделі Casson, оскільки вона є найбільш відомою моделлю опису неньютонівських рідин, до яких належать мазі.

Крім цього, для дослідження екструзійних властивостей за даними показників реологічних досліджень були розраховані значення коефіцієнтів динамічного розрідження мазей в двох інтервалах швидкостей зсуву. Значення першого коефіцієнту ( $K_{d1}$ ) визначали з використанням значень в'язкості системи при швидкостях зсуву 3,51 та 10,20  $\text{с}^{-1}$  (2.3), які відповідають швидкості руху долоні по поверхні шкіри або слизових оболонок при нанесенні мазі. Коефіцієнт  $K_{d2}$  визначали за значеннями в'язкості системи при швидкостях зсуву 27,0 та 148,0  $\text{с}^{-1}$  (2.4), які відповідають швидкості технологічної обробки мазі в процесі її виготовлення.

$$K_{d1} = \frac{\eta_{3,51} - \eta_{10,20}}{\eta_{3,51}} \cdot 100\% \quad (2.3)$$

$$K_{d2} = \frac{\eta_{27,0} - \eta_{148,0}}{\eta_{27,0}} \cdot 100\% \quad (2.4),$$

де  $K_{d1}$  та  $K_{d2}$  – коефіцієнти динамічного розрідження системи;

$\eta$  – структурна в'язкість при визначених швидкостях зсуву.

Для більш повної характеристики реологічних параметрів мазей було розраховане значення їх механічної стабільності. Вона забезпечує стійкість структури мазі та характеризує ступінь її руйнування в процесі деформацій [86]. Її обчислювали як відношення величини межі міцності структури мазей до руйнування ( $\tau_1$ ) до величини межі міцності структури після руйнування ( $\tau_2$ ) (2.5).

$$MS = \frac{\tau_1}{\tau_2} \quad (2.5)$$

## Висновки до розділу 2

1. Проведений аналітичний огляд асортименту готових ЛФ, зареєстрованих на фармацевтичному ринку України, які містять ментол, екстракти та настойки з

календули і евкаліпту. Результати аналізу показали, що в усіх випадках переважають препарати вітчизняного виробництва.

2. Проведений аналіз екстемпоральної рецептури Волинської, Хмельницької, Харківської, Сумської і Житомирської областей, в складі якої зустрічаються настойки евкаліпту та календули, а також ментол. Отримані результати свідчать, що найчастіше вони входять до складу розчинів та мазей аптечного виготовлення, які використовуються для лікування різних видів дерматиту.

3. Для проведення досліджень за вимогами ДФУ обрані три мазі аптечного виготовлення з даними компонентами та сформований алгоритм проведення досліджень відповідно до сучасних вимог ДФУ до ліків аптечного виготовлення з метою подальшого визначення їх стабільності.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

1. Порівняння фармакопейних підходів до контролю якості мазей аптечного виготовлення / Л. П. Савченко, В. А. Георгіянц, К. А. Умінська, В. О. Вракін. *Управління якістю в фармацевції*: мат. VI науково-практичної конференції з міжнародною участю, Харків, 17 квітня 2013 р. Харків, 2013. С. 114.

### РОЗДІЛ 3

## РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ МАЗЕЙ З НАСТОЙКАМИ ЕВКАЛІПТУ ТА КАЛЕНДУЛИ. ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЧИСТОТИ ТА РЕОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ

Основними діючими компонентами досліджуваних мазей з настоянками є декілька переважаючих біологічно активних речовин, для дослідження їх стабільності та контролю якості було вирішено розробити методи ГХ-ПФА, ГХ-МС та ГХ-ПД.

ГХ-ПФА останнім часом часто використовується для концентрування та аналізу летких органічних сполук. Він є достатньо простим та, водночас, не поступається за чутливістю іншим методам аналізу [48]. Метод є загально визнаним в аналізі вмісту алкоголю в крові і інших біологічних зразках [48, 64] та залишкових розчинників у фармацевтичних продуктах [46, 48]. ГХ-ПФА використовується в аналізі ароматизаторів у напоях, продуктах харчування, в парфумерній та косметичній продукції [48, 156].

Досить часто даний метод використовують для визначення складу та кількісного вмісту летких компонентів лікарської рослинної сировини. Він дозволяє визначити зміни в їх концентрації в процесі зберігання в різноманітних умовах. Перевагою використання такого аналізу є збереження структури досліджуваних речовин, а в поєднанні з екстракцією за допомогою правильно обраних розчинників дозволяє отримати найбільш чітку картину їх кількісного вмісту [130].

Проведення прямого визначення методом ГХ може спричинити потрапляння частинок ЛЗ чи іншого матеріалу в систему, впливаючи на точність аналітичного сигналу [48, 156] та викликаючи її забруднення [156]. Крім того, використання інших методів вимагає тривалої або вартісної пробопідготовки [48], чого не потребує проведення методом ГХ-ПФА. За рахунок можливості швидкого проведення аналізу він може бути використаний для визначення компонентного складу препаратів з екстрактами з лікарської рослинної сировини.

Для ідентифікації та визначення летких компонентів в ефірних оліях найкращим є метод ГХ-МС [148]. Він дозволяє розділити компоненти ефірної олії, виходячи з різниці в їх молекулярній масі [128]. Його перевагами є відсутність великих затрат часу та реактивів на пробопідготовку. З використанням методу внутрішньої нормалізації може бути визначене відсоткове співвідношення компонентів в досліджуваному зразку [149], однак, метод дозволяє визначити лише відносну концентрацію речовин [128, 149]. Для точного визначення кількісного вмісту речовин краще використовувати метод ГХ-ПІД [148].

### 3.1 Розробка методу ГХ-МС для вивчення стабільності мазі з настойкою евкالیпту

З огляду на те, що фармакологічна дія мазі обумовлена настойкою евкالیпту, в процесі контролю її якості необхідно контролювати вміст саме її компонентів. Для визначення вмісту рослинних компонентів мазі може бути використаний метод ГХ-МС. Він в подальшому може бути використаний для дослідження стабільності мазі в процесі зберігання [16].

*Методика проведення аналізу:* 1.00 г мазі розчиняють в 10 мл хлороформу при легкому нагріванні, розчин фільтрують через фільтр Q-MAX RR Syringe Filters (діаметр фільтру 25 мм, мембрана 0,22  $\mu\text{m}$  PTFE Hydrophobic) у віали. Як стандарт використовують настойку евкالیпту, яка входить до складу мазі.

*Умови хроматографування:* швидкість потоку в колонці 1.22 мл/хв, температура ін'єкції 270  $^{\circ}\text{C}$ , температура колонки 50  $^{\circ}\text{C}$ , режими ін'єкцій: splitless, час відбору проб 1.5 хв (під час аналізу мазі) та split-співвідношення 1:30 (під час аналізу настойки), газ-носії – гелій. Програма температурного режиму: початкова температура 50  $^{\circ}\text{C}$  (утримується 5 хвилин), зі швидкістю 5  $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  температура зростає до 200  $^{\circ}\text{C}$  (утримується 8 хвилин), зі швидкістю 40  $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  температура зростає до 310  $^{\circ}\text{C}$  (утримується 6 хвилин). Загальний час аналізу – 43 хвилини.

На початку дослідження був проведений аналіз настойки евкаліпту розробленим методом. В процесі аналізу було виділено вісімнадцять компонентів рослинного походження (рис. 3.1, табл. 3.1), які можуть бути використані як маркери для контролю якості мазі та вивчення її стабільності.

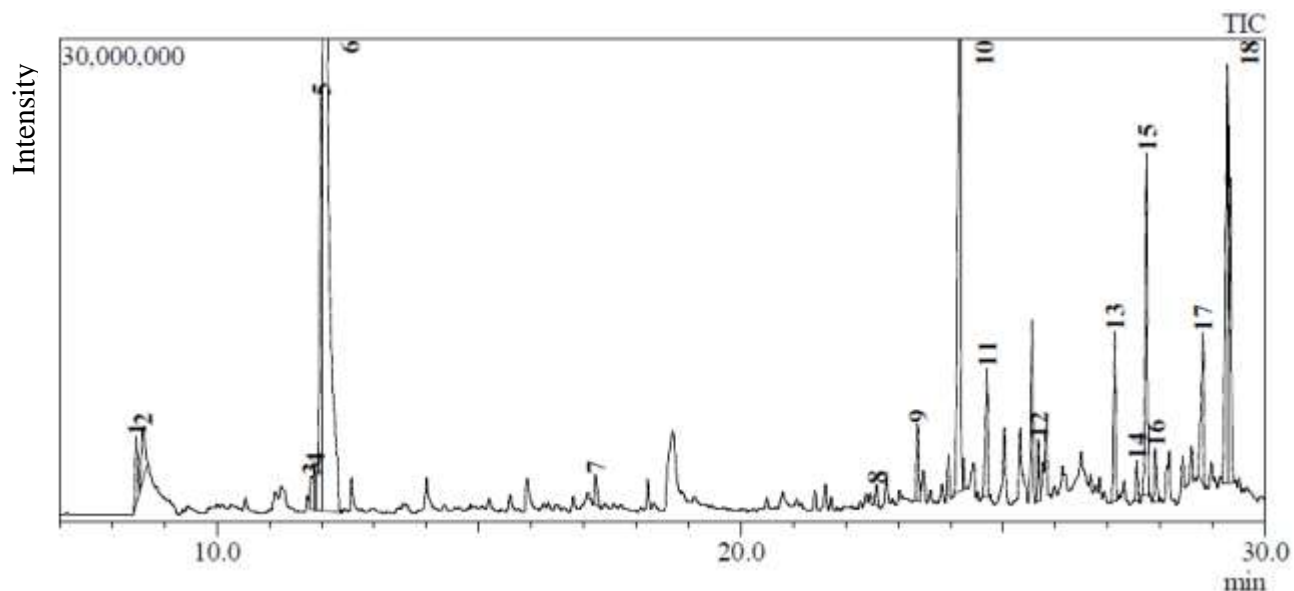


Рис. 3.1 Хроматограма спиртової настойки евкаліпту (аналіз методом ГХ-МС)

Таблиця 3.1

### Компоненти легкої фракції спиртової настойки евкаліпту

Назва сполуки	$t_R$ (хв)	Площа (%)	Площа
1 - $\alpha$ -пінен	8.59	2.76	28224238
2 - $\rho$ -цимен	11.80	0.87	8915496
3 - D-лимонен	11.87	0.76	7727676
<b>4 - 1,8-цинеол</b>	<b>12.07</b>	<b>45.94</b>	<b>469446063</b>
5 - L- $\alpha$ -терпінеол	17.23	0.60	6162088
6 - $\beta$ -бісаболен	22.59	0.38	3878876
7 - $\alpha$ -гур'юнен	23.37	1.30	13321934
<b>8 - аромандендрен</b>	<b>24.18</b>	<b>16.95</b>	<b>173265749</b>
9 - 9-епі-(E)-каріофілен	24.69	2.20	22514570
10 - цис- $\beta$ -гуайєн	25.67	0.96	9844078

11 - епіглобулол	27.13	2.56	26211224
12 - (-)-спатуленол	27.55	0.62	6381827
<b>13 - глобулол</b>	<b>27.74</b>	<b>5.98</b>	<b>61152285</b>
14 - ледел	27.91	1.02	10429961
15 - $\gamma$ -еудесмол	28.81	3.02	30889616
<b>16 - <math>\beta</math>-еудесмол</b>	<b>29.28</b>	<b>9.18</b>	<b>93851558</b>
<b>17 - <math>\alpha</math>-еудесмол</b>	<b>29.34</b>	<b>4.86</b>	<b>49702871</b>
18 - криптомеридіол	32.83	2.65	40788417

Серед виділених компонентів найбільшою площею піку характеризуються 1,8-цинеол (основний компонент ефірної олії евкаліпту), аромандендрен,  $\beta$ -еудесмол, глобулол та  $\alpha$ -еудесмол. Дані компоненти можуть бути використані як маркери для контролю якості та вивчення стабільності мазі, виготовленої з використанням настойки евкаліпту.

Після цього розробленим методом був проведений контроль якості мазі. Основою мазі є суміш ланоліну з вазеліном. Вазелін [7] практично нерозчинний у воді, малорозчинний у метиленхлориді, практично не розчинний в етанолі і гліцерині. Ланолін практично нерозчинний у воді, малорозчинний в киплячому безводному етанолі [89]. В процесі пробопідготовки мазь була розчинена в хлороформі, оскільки в ньому при невеликому нагріванні практично розчиняється її основа.

Аналіз мазі, розчиненої в хлороформі виявив наявність десяти сполук рослинного походження (рис. 3.2). Серед виявлених компонентів найбільшою концентрацією характеризуються 1,8-цинеол, аромандендрен, глобулол,  $\beta$ -еудесмол,  $\alpha$ -еудесмол та криптомеридіол (табл. 3.2) [16]. П'ять з шести сполук, які можуть бути використані як маркери при вивченні стабільності мазі з настойкою евкаліпту характеризуються великою концентрацією і в самій настойці, що свідчить про можливість використання такого ходу аналізу якості мазі з використанням методу ГХ-МС. Концентрація усіх сполук досить висока та їх

відсоткове співвідношення співпадає з отриманим співвідношенням компонентів настойки.

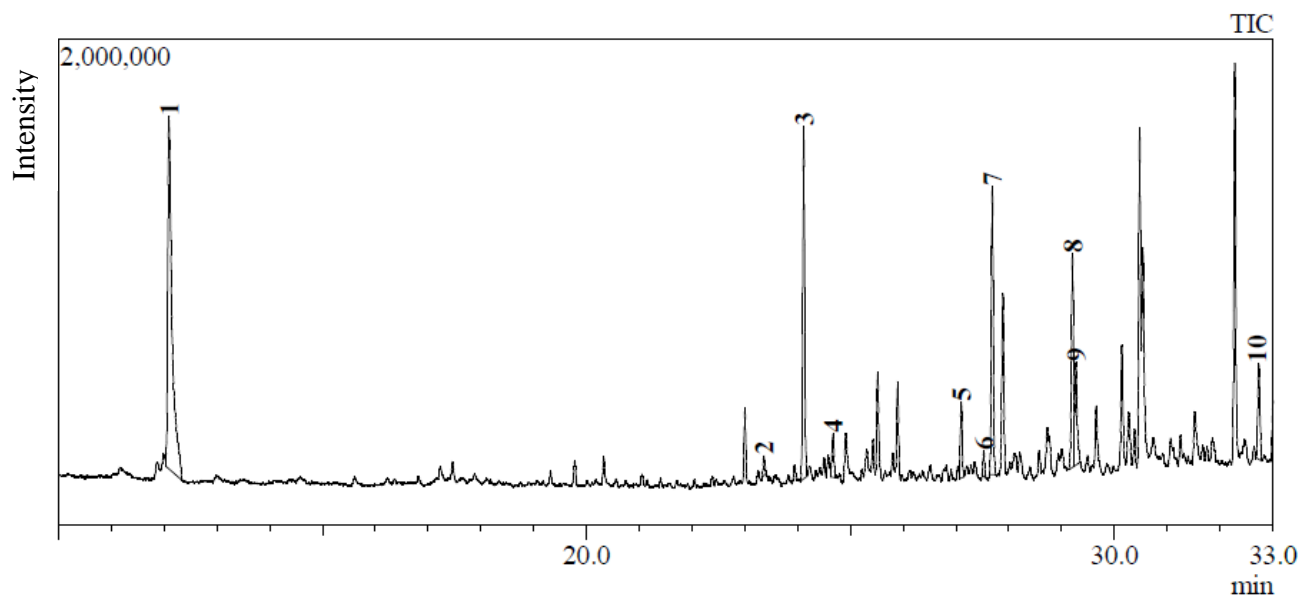


Рис. 3.2 Хроматограма хлороформного розчину мазі (аналіз методом ГХ-МС)

Таблиця 3.2

**Компоненти легкої фракції хлороформного розчину мазі з настойкою  
евкаліпту**

<i>Назва сполуки</i>	<i>t<sub>R</sub> (хв)</i>	<i>Площа (%)</i>	<i>Площа</i>
<b>1 - 1,8-цинеол</b>	<b>12.09</b>	<b>38.55</b>	<b>7839490</b>
2 - цис-β-гуайєн	23.36	0.90	182267
<b>3 - аромандендрен</b>	<b>24.12</b>	<b>16.94</b>	<b>3443828</b>
4 - аллоаромандендрен	24.67	2.33	474672
5 - епіглобулол	27.10	3.63	738611
6 - (-)-спатуленол	27.52	1.07	217168
<b>7 - глобулол</b>	<b>27.69</b>	<b>14.31</b>	<b>2910002</b>
<b>8 - β-еудесмол</b>	<b>29.20</b>	<b>11.31</b>	<b>2299524</b>
<b>9 - α-еудесмол</b>	<b>29.27</b>	<b>5.60</b>	<b>1137808</b>
<b>10 - криптомеридіол</b>	<b>32.73</b>	<b>5.37</b>	<b>1091518</b>

Розроблений метод ГХ-МС може бути використаний для вивчення стабільності мазі в процесі зберігання за хроматографічним профілем, отриманим в процесі дослідження з врахуванням зміни величини площі піку рослинних компонентів мазі та визначенням наявності додаткових сполук на хроматограмі.

### 3.2 Розробка методики ГХ-ПД для кількісного визначення 1,8-цинеолу в складі мазі з настійкою евкаліпту

Оскільки вміст 1,8-цинеолу є найбільшим серед інших компонентів ефірної олії евкаліпту [60, 62, 63, 66, 108, 146], вивчення стабільності мазі можна проводити за визначенням саме його вмісту. Для кількісного визначення 1,8-цинеолу в мазі може бути використаний метод ГХ-ПД, оскільки він з успіхом застосовується для його аналізу в ефірній олії евкаліпту [78].

*Методика приготування випробовуваного розчину:* 1.00 г мазі поміщають в мірний стакан, додають 5 мл хлороформу та розчиняють мазь при помірному нагріванні на водяній бані. Після повного розчинення отриманий розчин кількісно переносять в мірну колбу на 10.0 мл. Розчин охолоджують та доводять до мітки 10.0 мл хлороформом. Отриманий розчин фільтрують у віали через фільтр Q-MAX RR Syringe Filters (діаметр фільтру 25 мм, мембрана 0,22  $\mu\text{m}$  PTFE Hydrophobic) та проводять дослідження.

*Методика приготування розчину стандартного зразку 1,8-цинеолу:* 0.042 г 1,8-цинеолу розчиняють у метанолі в колбі на 100.0 мл. 1.0 мл отриманого розчину переносять в колбу на 100.0 мл та перемішують.

*Умови хроматографування:* швидкість потоку в колонці 1.25 мл/хв, температура ін'єкції 240  $^{\circ}\text{C}$ , об'єм ін'єкції 1  $\mu\text{l}$ , температура колонки 50  $^{\circ}\text{C}$ , режими ін'єкцій: split (split-співвідношення 1:10 для аналізу мазі та 1:50 для аналізу настійки), газ-носій гелій, температура детектора 320  $^{\circ}\text{C}$ . Програма температурного режиму: початкова температура 50  $^{\circ}\text{C}$  (утримується 5 хвилин), зі швидкістю 5  $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$  температура зростає до 200  $^{\circ}\text{C}$  (утримується 8 хвилин), зі



швидкістю 40 °C/хв температура зростає до 310 °C (утримується 6 хвилин). Загальний час аналізу – 51.75 хвилини.

Перед проведенням аналізу були визначені параметри придатності системи відповідно до вимог статті 2.2.46. “Методи хроматографічного розділення” ДФУ [8]. Дослідження проводили шляхом аналізу шести послідовних ін’єкцій розчину 1,8-цинеолу в концентрації  $4.2 \times 10^{-6}$  г/мл. При проведенні аналізу за допомогою програмного забезпечення були визначені основні параметри придатності системи: число теоретичних тарілок (N), фактор утримування (k), коефіцієнт симетрії ( $A_s$ ) (табл. 3.3). Для кожного з них було розраховане значення відносного стандартного відхилення. Для основних параметрів кількісного визначення (час утримування ( $t_R$ ), площа і висота піку, концентрація компоненту) також було розраховане значення збіжності відгуку  $S_r$ , % (стаття 2.2.46) [8].

Таблиця 3.3

**Параметри придатності методики кількісного визначення 1,8-цинеолу  
методом ГХ-ПД**

<i>Назва параметру</i>	<i>Отримані значення</i>
Час утримування ( $t_R$ )	13.10 хв ( $S_r=0.036$ %)
Площа піку	9255 ( $S_r=1.09$ %)
Висота піку	3438 ( $S_r=1.30$ %)
Концентрація 1,8-цинеолу	$4.18 \times 10^{-6}$ г/мл ( $S_r=1.25$ %)
N	548885 ( $RSD=2.87$ %)
$A_s$	1.15 ( $RSD=1.25$ %)
k	5.59 ( $RSD=1.48$ %)

Максимально допустиме значення  $S_r(\%)_{max}$  при шести паралельних ін’єкціях складає 2.75 % (при допусках вмісту  $\pm 10$  %). Ні одне із розрахованих значень не перевищує встановлений критерій, що свідчить про придатність методики для визначення кількісного вмісту 1,8-цинеолу в мазі. Значення коефіцієнту симетрії піку також відповідає вимогам ( $A_s=1.15$ , знаходиться в межах від 0.8 до 1.5).

Час утримування 1,8-цинеолу при аналізі розчину стандартного зразку склав 13.10 хв (рис. 3.3).

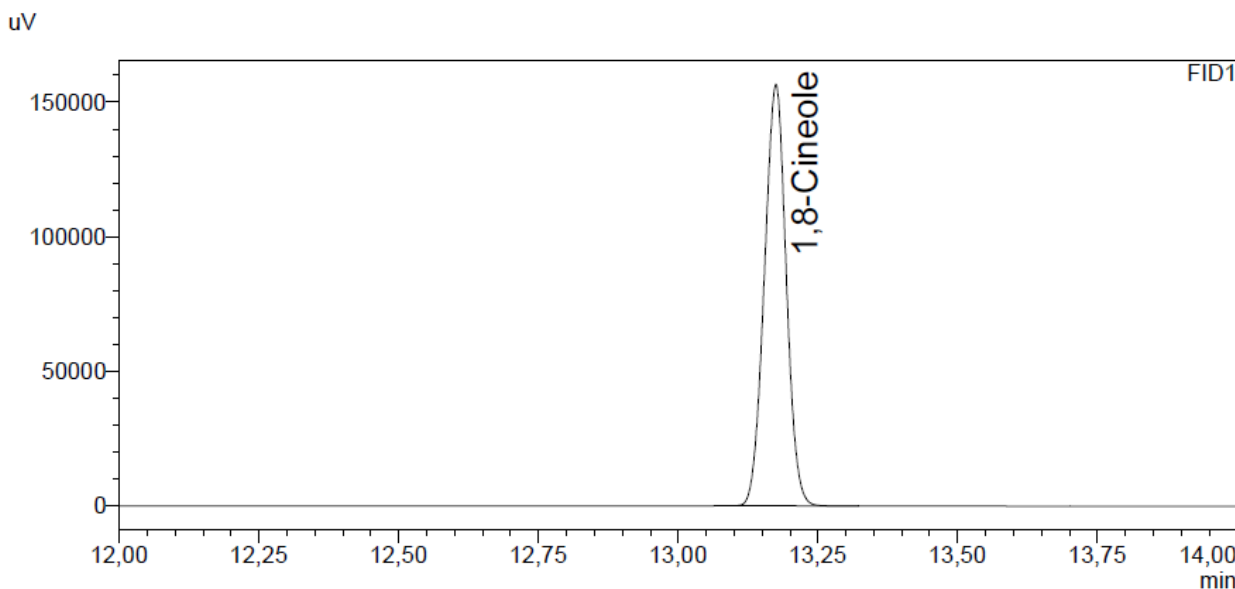


Рис. 3.3 Хроматограма розчину стандартного зразку 1,8-цинеолу

Згідно з вимогами статті 5.3.N.1 “Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту”<sup>N</sup> та 5.3.N.2 “Валідація аналітичних методик і випробувань” [8] була здійснена валідація розробленої методики.

Для її проведення були виготовлені модельні розчини 1,8-цинеолу за наступною схемою: 0.03545 г 1,8-цинеолу розчиняють в колбі на 10.0 мл в хлороформі. Потім готують послідовні розведення розчину, проводячи щоразу його розведення вдвічі.

За вимогами ДФУ до валідації першим етапом її проведення є прогноз невизначеності результатів аналізу, який складається з невизначеності пробопідготовки та невизначеності проведення аналізу. Максимальне його значення для допусків вмісту  $\pm 10\%$  складає 3.20 %.

Загальна невизначеність пробопідготовки методики склала 0.90 % (табл. 3.4). Отримане значення не перевищує допустимий критерій ( $\Delta_{SP,r} = 0.90 \leq 0.32 \times \max \Delta_{As} = 1.02\%$ ).

Повна невизначеність результатів аналізу буде складати:

$\Delta_{As,r} = \sqrt{\Delta_{SP,r}^2 + \Delta_{FAO,r}^2} = \sqrt{0.90^2 + 0.75^2} = 1.17\%$ . Отримане значення в два з половиною

рази менше максимально допустимого значення ( $\max \Delta_{As}=3.20 \%$ ), що свідчить про можливість використання методики для кількісного визначення 1,8-цинеолу.

Таблиця 3.4

**Розрахунок невизначеності пробопідготовки методики кількісного визначення 1,8-цинеолу в мазі**

Операція пробопідготовки	Невизначеність, %
<i>Розчин порівняння</i>	
Зважування 1,8-цинеолу на аналітичних вагах	$0.0002/0.03545 \times 100=0.56$
Розведення в мірній колбі на 10.0 мл	0.50
Невизначеність приготування розчину порівняння	$\Delta_{SP}^{st} = \sqrt{0.56^2 + 0.50^2} = 0.75$
<i>Випробовуваний розчин</i>	
Зважування мазі на аналітичних вагах	$0.0002/1.0 \times 100=0.02$
Розведення в мірній колбі на 10.0 мл	0.50
Невизначеність приготування випробовуваного розчину	$\Delta_{SP} = \sqrt{0.02^2 + 0.50^2} = 0.50$
Загальна невизначеність пробопідготовки ( $\Delta_{SP,r}$ )	$\Delta_{SP,r} = \sqrt{0.75^2 + 0.50^2} = 0.90$

Визначення валідаційних характеристик методики проводили в концентраційному діапазоні від  $1.73 \times 10^{-6}$  г/мл до  $3.55 \times 10^{-3}$  г/мл з дванадцятьма точками аналізу на всьому концентраційному діапазоні. За результатами аналізу були визначені параметри лінійної залежності методики (табл. 3.5).

Отримані результати свідчать про відповідність параметрів лінійної залежності встановленим критеріям.

За отриманими результатами був побудований графік лінійної залежності площі піку від концентрації 1,8-цинеолу в нормалізованих координатах (рис. 3.4).

**Параметри лінійної залежності методики кількісного визначення 1,8-цинеолу  
методом ГХ-ПД**

Величина	Значення	Допустимі критерії	Висновок про відповідність
$b$	0.99	-	-
$S_b$	0.0012	-	-
$(b-1)$	0.01	-	відповідає
$a$	1.27	статистична незначущість $a \leq t(95\%, n-2) \times S_a$ ( $a \leq 1.16$ ) практична незначущість $a \leq 5.12$	виконується за другим критерієм
$S_a$	0.64	-	-
$S_0$	1.71	$\max S_0 = 1.77$	відповідає
$r$	0.9999	$R_c \geq 0.9916$	відповідає

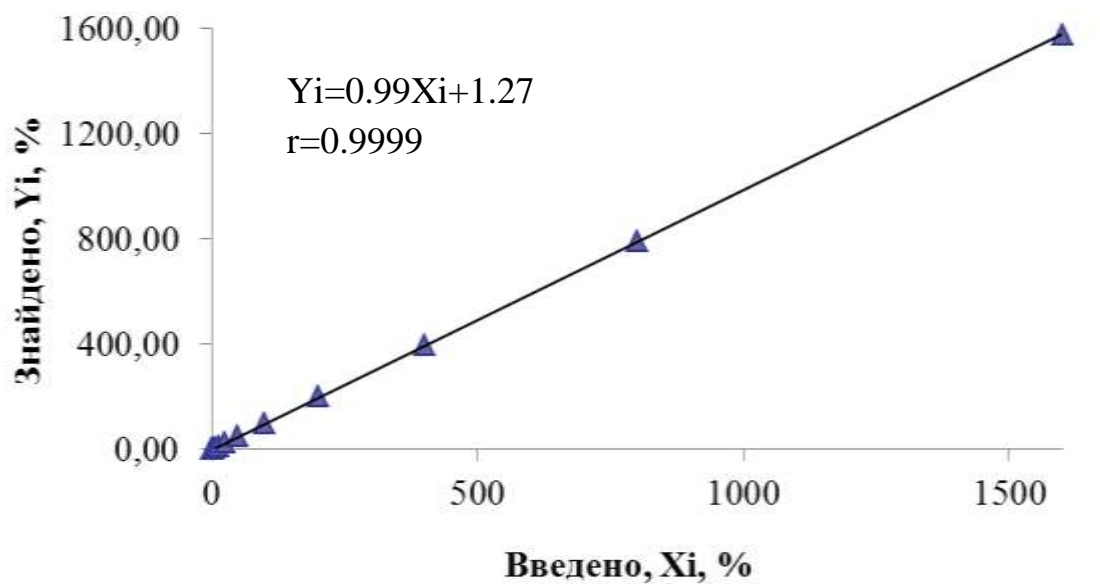


Рис. 3.4 Графік лінійної залежності площі піку 1,8-цинеолу від його концентрації у нормалізованих координатах

В процесі вивчення лінійності методики була визначена межа виявлення (МВ) та межа кількісного визначення (МКВ) 1,8-цинеолу, які склали  $3.76 \times 10^{-8}$  г/мл та  $1.14 \times 10^{-7}$  г/мл відповідно. Отримані значення підтверджують достатню чутливість методики, оскільки концентрація 1,8-цинеолу в досліджуваному розчині, виготовленому з мазі склала  $7 \times 10^{-6}$  г/мл.

З використанням результатів, отриманих при вивченні лінійності були розраховані параметри правильності (систематична похибка,  $\delta$ ) та прецизійності (однобічний довірчий інтервал значень,  $\Delta_z$ ) (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

**Результати вивчення правильності та прецизійності методики кількісного визначення 1,8-цинеолу методом ГХ-ПД**

<i>Величина</i>	<i>Значення</i>
$\bar{z}$	100.94
$S_z$	0.40
$\Delta_z$	0.72
Критерій для однобічного довірчого інтервалу $\Delta_z \leq \Delta_{As}$ ( $0.72 \leq 3.20$ )	
$\delta$	0.94
Критерій статистичної незначущості $\delta, \% \leq 0.21$	
Критерій практичної незначущості $\delta, \% \leq 0.32 \times \Delta_{As} = 1.02$	

З отриманих даних видно, що виконуються вимоги до параметрів правильності (за критерієм практичної незначущості) та прецизійності методики.

Для визначення кількості 1,8-цинеолу, який входить до складу мазі був попередньо проведений аналіз настойки евкаліпту, використаної для виготовлення мазі тим же методом після розчинення 1.0 мл настойки в хлороформі в колбі на 10.0 мл (рис. 3.5) та аналіз хлороформного розчину мазі (рис. 3.6). На хроматограмах чітко видно пік 1,8-цинеолу.

Вміст 1,8-цинеолу в настійці був визначений шляхом трьох послідовних аналізів. Він склав  $1.38 \times 10^{-4}$  г/мл. Визначення кількісного вмісту 1,8-цинеолу в

мазі було здійснене шляхом чотирьох послідовних аналізів з наступним розрахунком параметру збіжності отриманих результатів (табл. 3.7).

uV

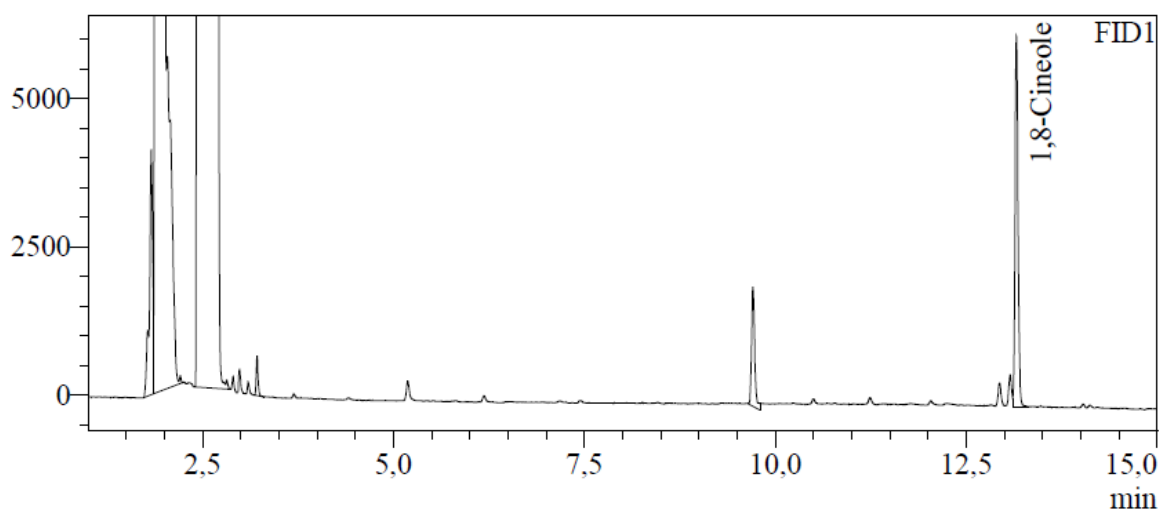


Рис. 3.5 Хроматограма настойки евкаліпту (аналіз методом ГХ-ПД)

uV

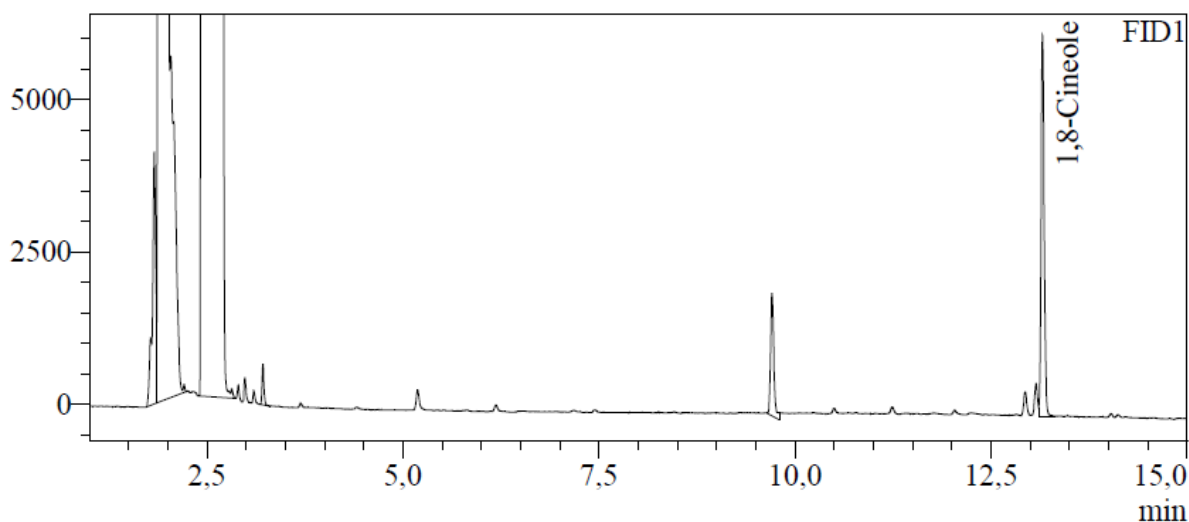


Рис. 3.6 Хроматограма хлороформного розчину мазі з настойкою евкаліпту

Таблиця 3.7

**Оцінка збіжності результатів кількісного визначення 1,8-цинеолу в мазі**

<i>№ зразка</i>	<i>Площа піку 1,8-цинеолу</i>	<i>Концентрація 1,8-цинеолу, мкг/мл</i>
1.	14356	6.84

2.	14435	6.88
3.	14579	6.95
4.	14419	6.87
<i>Середнє</i>	14447.25	6.89
<i>RSD, %</i>	0.65	0.68

За вимогами статті 2.2.46 ДФУ [8] максимальне допустиме відносне стандартне відхилення при чотирьох паралельних ін'єкціях складає 1.92 %. Отримані результати свідчать про відповідність параметру збіжності методики.

Отримані результати свідчать про зниження концентрації 1,8-цинеолу в мазі, що пояснюється вмістом ланоліну в складі її основи зі здатністю проявляти окисні властивості. Таке зниження концентрації вимагає проведення додаткових досліджень стабільності мазі з кількісним визначенням вмісту 1,8-цинеолу та визначенням впливу ланоліну на стабільність препарату в процесі зберігання.

За результатами аналізу хлороформного розчину мазі була визначена придатність системи та інші хроматографічні параметри (табл. 3.8). Для кожного з них були розраховані значення відносного стандартного відхилення.

Таблиця 3.8

**Хроматографічні параметри методики кількісного визначення 1,8-цинеолу  
методом ГХ-ШД**

<i>Назва</i>	<i>Значення</i>
Час утримування ( $t_R$ ), хв	13.14 (RSD, %=0.043)
Число теоретичних тарілок (N)	546863 (RSD, %=2.54)
Фактор утримування (k)	6.20 (RSD, %=0.046)
Коефіцієнт симетрії ( $A_s$ )	1.15 (RSD, %=2.52)
Ступінь розділення ( $R_s$ )	1.16 (RSD, %=1.41)

Отримані результати свідчать про належне функціонування колонки та придатність системи для кількісного визначення 1,8-цинеолу в мазі.

### 3.3 Оцінка мікробіологічної чистоти мазі з настойкою евкаліпту

Вивчення мікробіологічної чистоти мазі проводили методом двошарового висівання (5-2-2-3, національна частина статті 2.6.12.). При визначенні мікробіологічної чистоти використовували метод розрахунку на чашках Петрі. Перед проведенням досліджень за вимогами статті 2.6.12. була визначена придатність методики дослідження мікробіологічної чистоти. Для цього готували розведення лікарської форми 1:10 та контрольний розчин без додавання лікарської форми, як описано в розділі 2.

Отримані результати перевірки придатності методики визначення аеробних мікроорганізмів (табл. 3.9) свідчать, що зразки мазі в розведенні 1:10 не виявляють протимікробну дію по відношенню до *S. aureus*, *P. aeruginosa* та *B. subtilis*.

Таблиця 3.9

#### Результати перевірки придатності методики визначення загального числа аеробних мікроорганізмів

Середнє число КУО в 1 г зразка					
<i>S. aureus</i> ATCC 6538		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	
дослід	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль
Соево-казеїновий агар					
90	92	100	102	96	94

Випробування на виявлення пригнічувальної дії зразку мазі в розведенні 1:10 на Сабуро-декстрозному агарі свідчать про її відсутність по відношенню до грибів *C. albicans* та *A. brasiliensis* (табл. 3.10).



Таким чином, методика може бути використана для випробування на загальне число мікроорганізмів та грибів досліджуваного зразку мазі. В процесі дослідження визначали кількість мікроорганізмів на чашках Петрі та розраховували середнє арифметичне отриманих значень (табл. 3.11) за методиками, наведеними в розділі 2.

Таблиця 3.10

**Результати перевірки придатності методики визначення загального числа дріжджових та плісневих грибів**

Середнє число КУО в 1 г зразка			
<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	
дослід	контроль	дослід	контроль
Сабуру-декстрозний агар			
94	102	90	98

Таблиця 3.11

**Результати дослідження мікробіологічної чистоти мазі з настійкою евкаліпту**

ТАМС, КУО/г	ТУМС, КУО/г	Мікроорганізми	
		<i>St. aureus</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>
свіжовиготовлена мазь			
до 10	до 10	-	-
через 10 днів зберігання			
10	до 10	-	-
через 20 днів зберігання			
10	до 10	-	-
через 30 днів зберігання			
20	до 10	-	-

«-» означає повну відсутність бактерій у зразку.

Інкубація зразків мазі на манітно-сольовому та цетримідному агарах показала відсутність колоній на поживному середовищі в чашках Петрі, що відповідає вимогам ДФУ – відсутність бактерій *St. aureus* та *Ps. aeruginosa*. Отримані результати по вивченню мікробіологічної чистоти зразків мазі свідчать про їх відповідність вимогам статті 5.1.4. ДФУ за показником мікробіологічна чистота. Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів (ТАМС) при зберіганні мазі протягом 30 днів склало 20 КУО/г, а загальне число життєздатних дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) – до 10 КУО/г.

### 3.4 Вивчення реологічних параметрів мазі з настояюкою евкаліпту

Для встановлення стійкості структури мазі в процесі зберігання, визначення типу її течії та наявності тиксотропних властивостей була побудована реограма течії зразку свіжовиготовленої мазі (рис. 3.7). Вона представляє собою залежність величини напруги зсуву від величини градієнту швидкості зсуву. Отримані результати свідчать про те, що мазь відноситься до систем з неньютонівським типом плинності [149].

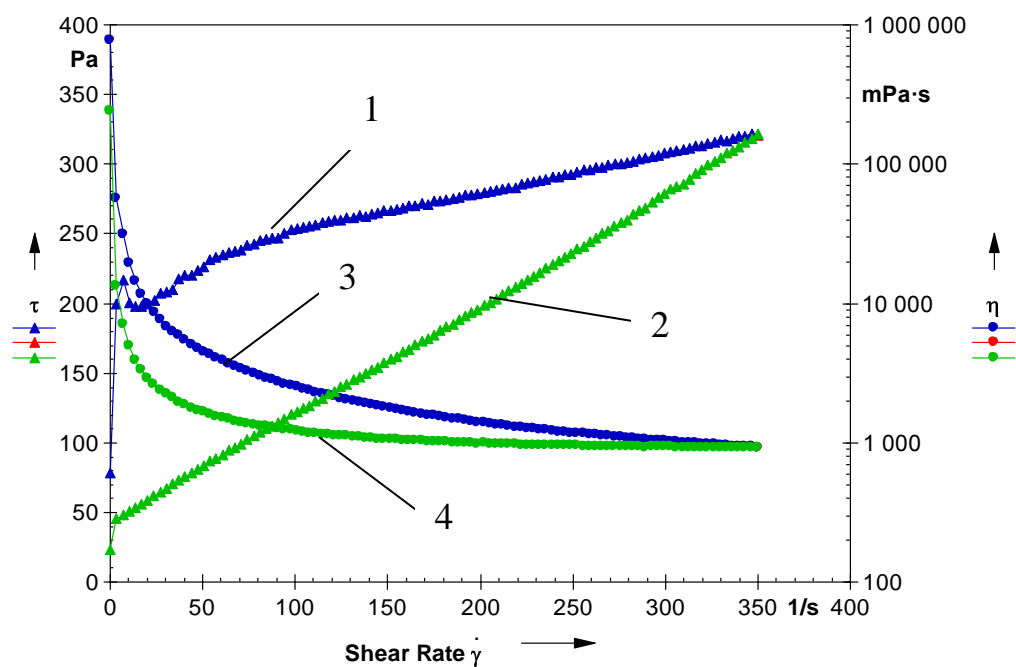


Рис. 3.7 Реограма плинності мазі з настояюкою евкаліпту

Висхідна крива (рис. 3.7, 1) характеризує процес руйнування системи та зниження структурної в'язкості системи під дією прикладеної сили, а низхідна крива (рис. 3.7, 2) характеризує процес відновлення системи після припинення дії зовнішніх сил. Дві криві на реограмі плинучості утворюють петлю гістерезису. Її утворення характеризує наявність у мазі тиксотропних властивостей, що свідчить про гарне її нанесення на шкіру та підтверджує присутність в її структурі коагуляційних зв'язків, які здатні відновлюватись після руйнування.

Досліджувана мазь характеризується наявністю граничної напруги зсуву (39,55 Па). Вона характеризує незначну стійкість системи до дії зовнішньої руйнуючої сили (швидкості зсуву). Протягом даного періоду мазь поводить себе як тверде тіло. За рахунок наявності такої граничної межі мазь характеризується псевдопластичним типом плинучості. В'язкість мазі залежить від градієнту швидкості зсуву: чим він більше, тим менше в'язкість ЛФ (рис. 3.7, 3). Однак, з графіку 2 (рис. 3.7, 4) видно, що в період зменшення напруги в'язкість зразку мазі відновлюється. Це явище ще раз підтверджує, що система є тиксотропною.

Мазь має невисокі показники структурної в'язкості. Так, при початковій нарузі зсуву  $0,01 \text{ c}^{-1}$  структурна в'язкість складає  $766 \text{ Па} \times \text{с}$ . Поступове збільшення градієнту швидкості зсуву призводить до часткового руйнування системи, знижуючи її структурну в'язкість до показника  $0,92 \text{ Па} \times \text{с}$ . При припиненні дії деформаційних сил система швидко відновлюється.

В таблиці 3.12. наведені розраховані основні реологічні параметри мазі.

Коефіцієнти динамічного розрідження мазі свідчать про можливість її зручного нанесення на шкіру, задовільного розрідження мазі в процесі приготування з рівномірним розподілом компонентів мазі в основі.

Невелике значення показника механічної стабільності мазі свідчить про незначну ступінь руйнування її структурного каркасу та підтверджує наявність в системі коагуляційних зв'язків. Здатність до відновлення свідчить про можливість витримувати механічний вплив при виготовленні та в процесі нанесення на шкіру. Таким чином, одержані результати свідчать, що досліджувана мазь має достатню тиксотропність, спроможна розріджуватися на шкірі під час нанесення, добре

намазуватися та має задовільну консистенцію.

Таблиця 3.12

**Реологічні параметри мазі з настойкою евкالیпту**

№	Показник	Значення
1.	Площа гістерезису, $A$ , Па/с	31172,47
2.	Гранична напруга зсуву $\tau_0$ , Па	39,55
3.	Структурна в'язкість при $\tau_0$ , $\eta_\infty$ , Па×с	0,39
4.	Коефіцієнт динамічного розрідження, $K_{d1}$ , % (висхідна крива)	65,67
5.	Коефіцієнт динамічного розрідження, $K_{d2}$ , % (висхідна крива)	76,50
6.	Коефіцієнт динамічного розрідження, $K_{d1}$ , % (низхідна крива)	62,48
7.	Коефіцієнт динамічного розрідження, $K_{d2}$ , % (низхідна крива)	55,65
8.	Механічна стабільність, MS	1,41

Для оцінки стабільності мазі та ступеня збереження її реологічних параметрів було проведене визначення її структурно-механічних параметрів протягом 30 днів. Отримані реограми (рис. 3.8) доводять збереження стабільності структурно-механічних властивостей мазі протягом місяця. Вони майже накладаються одна на одну, що свідчить про стабільність структурно-механічних властивостей мазі [149].

Значення структурної в'язкості мазей протягом місяця також незначно відрізняються одне від одного (табл. 3.13), що підтверджує стабільність лікарської форми. Зміна значення структурної в'язкості трьох зразків мазі, виражена у відсотках, коливається у межах  $\pm 12$  %, що свідчить про збереження реологічних властивостей мазі.

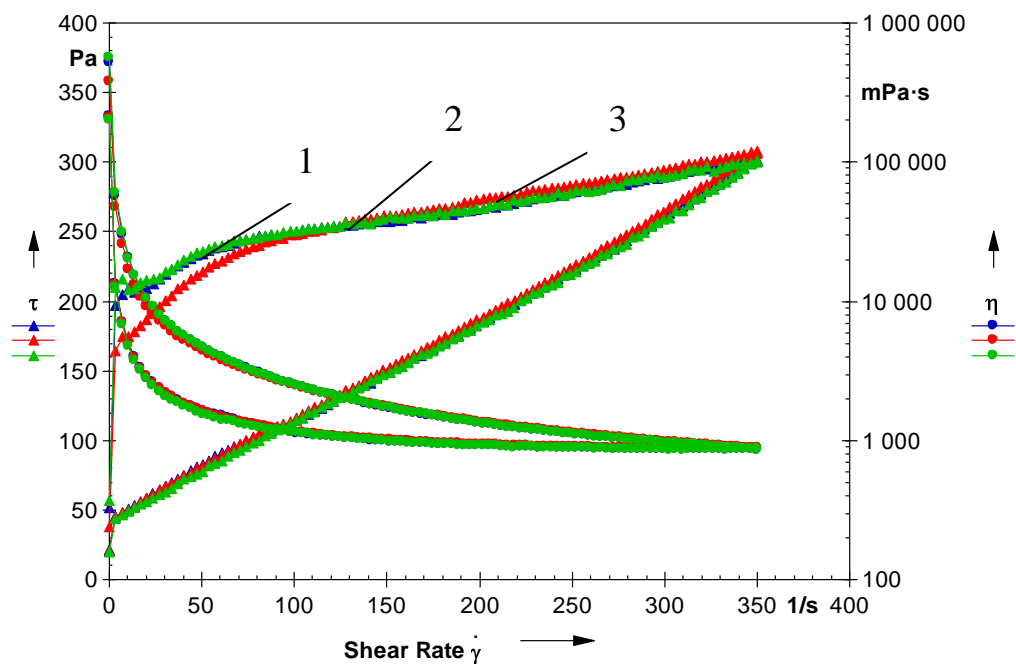


Рис. 3.8 Реограми плину мазі з настійкою евкаліпту протягом місяця: 1 – через 10 днів після приготування; 2 – через 20 днів після приготування; 3 – через 30 днів після приготування

Таблиця 3.13

**Значення структурної в'язкості досліджуваних зразків мазі з настійкою евкаліпту протягом місяця**

№ зразка	Структурна в'язкість (Па·с) досліджуваних зразків мазі в залежності від швидкості зсуву, $D_r$ $s^{-1}$							
	0,10	50,6	101,0	152,0	202,0	252,0	303,0	350,0
1	766	4,47	2,51	1,74	1,39	1,17	1,02	0,97
2	751	4,65	2,48	1,72	1,32	1,11	0,96	0,86
	(-1,96)	(+4,03)	(-1,20)	(-1,15)	(-5,04)	(-5,13)	(-5,88)	(-11,34)
3	717	4,63	2,47	1,70	1,32	1,10	0,96	0,86
	(-6,40)	(+3,57)	(-1,59)	(-2,30)	(-5,04)	(-5,98)	(-5,88)	(-11,34)
4	731	4,38	2,45	1,72	1,35	1,12	0,97	0,88
	(-4,57)	(-2,01)	(-2,39)	(-1,15)	(-2,88)	(-4,27)	(-4,90)	(-9,27)

Примітка.  $n = 5$ ,  $p \leq 0,05$  – відхилення показника достовірне в порівнянні з контролем (№ 1 – свіжовиготовлена мазь; № 2 – мазь через 10 днів після

приготування; № 3 – мазь через 20 днів після приготування; № 4 – мазь через 30 днів після приготування)

Для трьох досліджуваних зразків мазі були розраховані основні реологічні параметри (табл. 3.14). Отримані показники майже не відрізняються один від одного, що свідчить про збереження реологічних параметрів мазі протягом місяця.

Таблиця 3.14

**Показники реологічних параметрів мазі з настойкою евкالیпту протягом 30 днів**

№	Показник	Значення		
		10 днів	20 днів	30 днів
1.	Площа гістерезису, $A$ , Па/с	32810,16	31935,35	30697,16
2.	Гранична напруга зсуву $\tau_0$ , Па	37,14	39,86	37,07
3.	Структурна в'язкість при $\tau_0$ , $\eta_\infty$ , Па×с	0,37	0,36	0,38
4.	Коефіцієнт динамічного розрідження, $K_{d1}$ , % (висхідна крива)	66,22	63,46	64,08
5.	Коефіцієнт динамічного розрідження, $K_{d2}$ , % (висхідна крива)	78,18	78,25	75,69
6.	Коефіцієнт динамічного розрідження, $K_{d1}$ , % (низхідна крива)	62,06	62,33	62,08
7.	Коефіцієнт динамічного розрідження, $K_{d2}$ , % (низхідна крива)	56,02	58,28	57,56
8.	Механічна стабільність, MS	1,44	1,43	1,44

3.5 Розробка методу ПФА для вивчення стабільності мазі з настойками календули та евкالیпту

Оскільки до складу мазі входять спиртові настойки календули та евкаліпту, було вирішено застосувати метод ГХ-ПФА для ідентифікації речовин-маркерів, які можуть бути використані для вивчення стабільності мазі при зберіганні та в процесі використання. Кількісне визначення летких компонентів лікарських препаратів є досить трудомістким за рахунок тривалої пробопідготовки, а використання ГХ-ПФА при вивченні якості та стабільності препаратів за зменшенням концентрації летких компонентів не потребує великих затрат часу на пробопідготовку та проведення дослідження.

*Умови хроматографування:* температура витримання віал перед проведенням аналізу 50 °С, час витримання для досягнення стану рівноваги – 30 хвилин. Швидкість потоку в колонці 1.22 мл/хв, температура ін'єкції 260 °С, об'єм ін'єкції – 10  $\mu$ л, температура колонки 50 °С, режим впорскування – split, split-співвідношення 1:20, газ-носії гелій. Програма температурного режиму: початкова температура 50 °С (утримується 5 хвилин), протягом 5 хвилин температура зростає до 200 °С (утримується 8 хвилин) і до 40 хвилини температура піднімається до 310 °С (утримується 6 хвилин). Загальний час аналізу – 50 хвилин [32, 33].

Першим етапом дослідження став аналіз настойки календули. Його результати (рис. 3.9) дозволили ідентифікувати в ній два основних компоненти рослинного походження з близькими значеннями часу утримування.

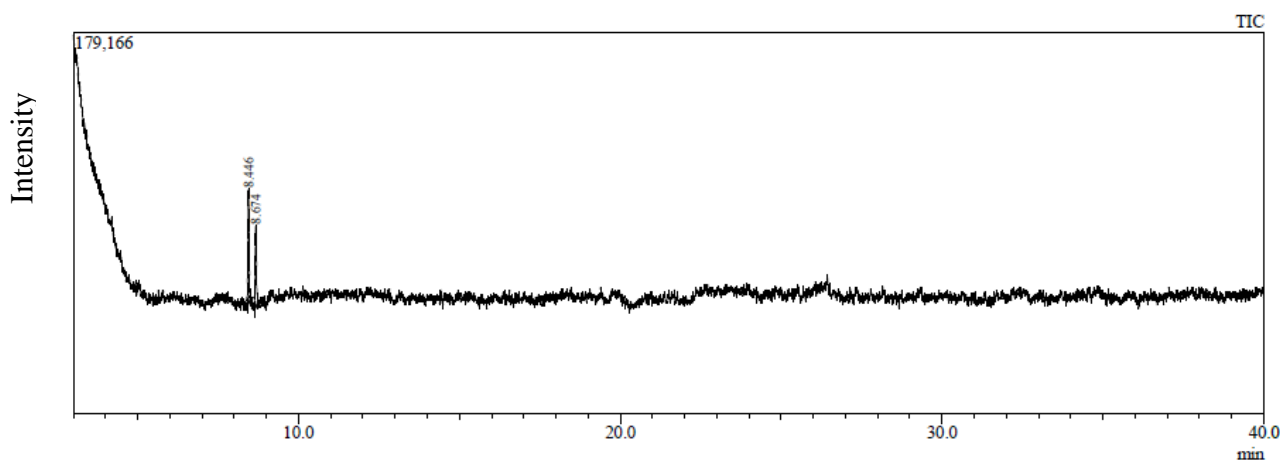


Рис. 3.9 Хроматограма настойки календули (аналіз методом ГХ-ПФА)

Основний із них  $\alpha$ -феландрен (57.08 %) з часом утримування 8.45 хв. Трохи нижчою концентрацією характеризується  $\alpha$ -пінен (42.92 %) з часом утримування 8.67 хв.

ГХ-ПФА настойки евкаліпту показав наявність більшої кількості маркерів (рис. 3.10). В результаті проведеного аналізу ідентифіковано дев'ять сполук, серед яких п'ять з концентрацією вище 5 %, інші – мінорні сполуки.

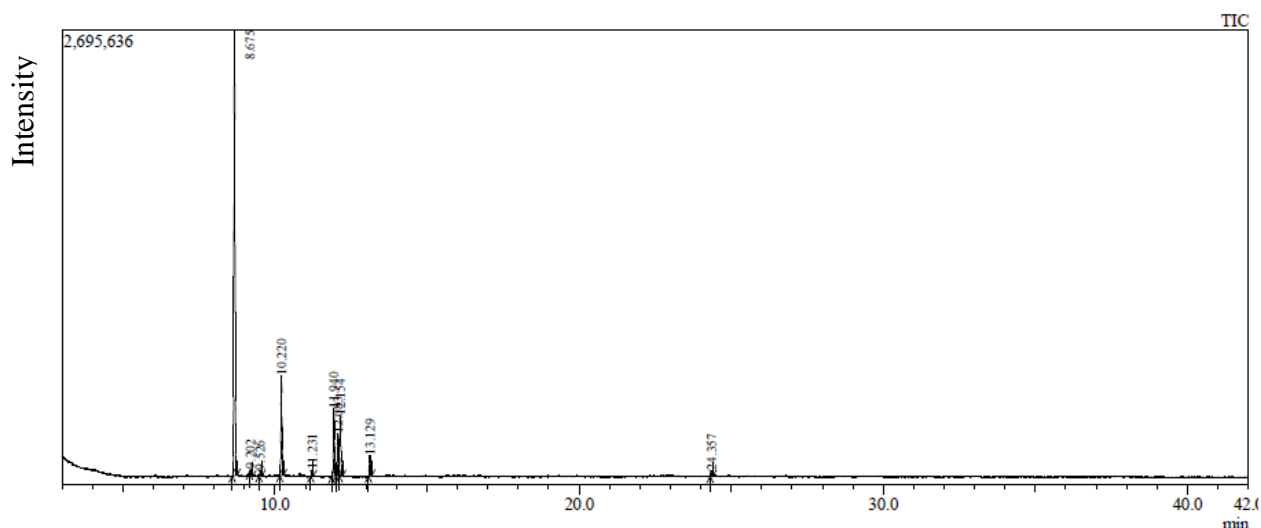


Рис. 3.10 Хроматограма настойки евкаліпту (аналіз методом ГХ-ПФА)

Найвищою концентрацією серед них характеризується  $\alpha$ -пінен (58.71 %) з часом утримування 8.68 хв. Крім нього серед основних летких компонентів настойки виявлені  $\beta$ -пінен (13.25 %) з часом утримування 10.22 хв,  $\rho$ -цимен (8.49 %) – 11.94 хв, 1,8-цинеол (7.95 %) – 12.15 хв та лимонен (5.91 %) – 12.08 хв. Серед мінорних сполук найвищою концентрацією характеризується  $\gamma$ -терпінен (2.74 %) – 13.13 хв. Інші сполуки характеризуються майже однаковою концентрацією: аромандрен (0.82 %) – 24.36 хв,  $\alpha$ -феландрен (0.77 %) – 11.23 хв, камфен (0.61 %) – 9.20 хв.

За існуючими рекомендаціями [94] ЛФ для проведення аналізу було вирішено розчинити в органічних розчинниках. Тому спершу було здійснено вибір оптимального розчинника для мазі, який би дозволив повністю розчинити всі компоненти ЛФ та забезпечити їх легке вивільнення [33]. Результати парофазного аналізу розчинів характеризуються кращою відтворюваністю



результатів та більшою зручністю роботи, ніж при проведенні аналізу з нерозчиненою маззю. Крім того, переведення мазі в розчин забезпечить швидше досягнення стану рівноваги між концентрацією летких речовин у розчиненому зразку та вільному просторі віали. Основою мазі є масло вазелінове та ланолін. Вазелінове масло не розчинне у воді, мало розчинне в етанолі, змішується з вуглеводнями [7], а ланолін практично нерозчинний у воді, малорозчинний в киплячому безводному етанолі [89]. Крім цього, до складу мазі входить диметилсульфоксид, який змішується з водою та етанолом [7]. З огляду на властивості компонентів мазі для подальших досліджень були обрані гексан та хлороформ.

Для проведення аналізу у віали поміщали наважки мазі (по 1.00 г), розчинені в 5 мл гексану та в 5 мл хлороформу. Як стандарти були використані настойки календули і евкаліпту, які входять до складу мазі, в кількості, яка була в наважці мазі, використаній для аналізу (по 0.135 мл, настойки були взяті за допомогою одноканальної автоматичної піпетки Eppendorf Research Plus 100-1000 мкл).

Отримана хроматограма (рис. 3.11) мазі, розчиненої в гексані свідчить про наявність однієї сполуки-маркера рослинного походження – 1,8-цинеолу (час утримування 12.04 хв). Всі інші компоненти є компонентами розчинника.

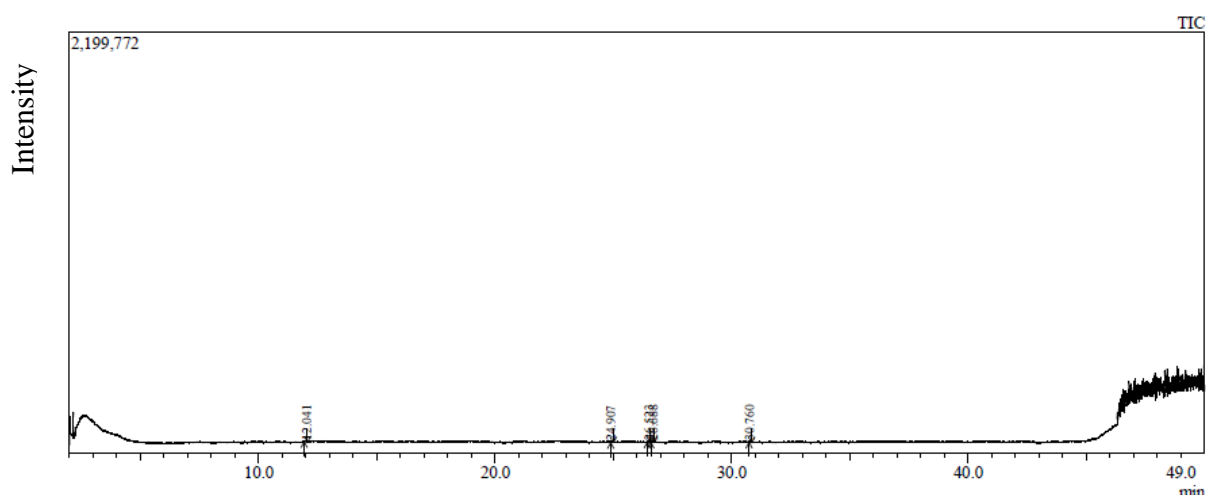


Рис. 3.11 Хроматограма мазі, розчиненої в гексані (аналіз методом ГХ-ПФА)

На хроматограмі зразку мазі, розчиненої в хлороформі, ідентифіковано три сполуки-маркери рослинного походження (рис. 3.12).

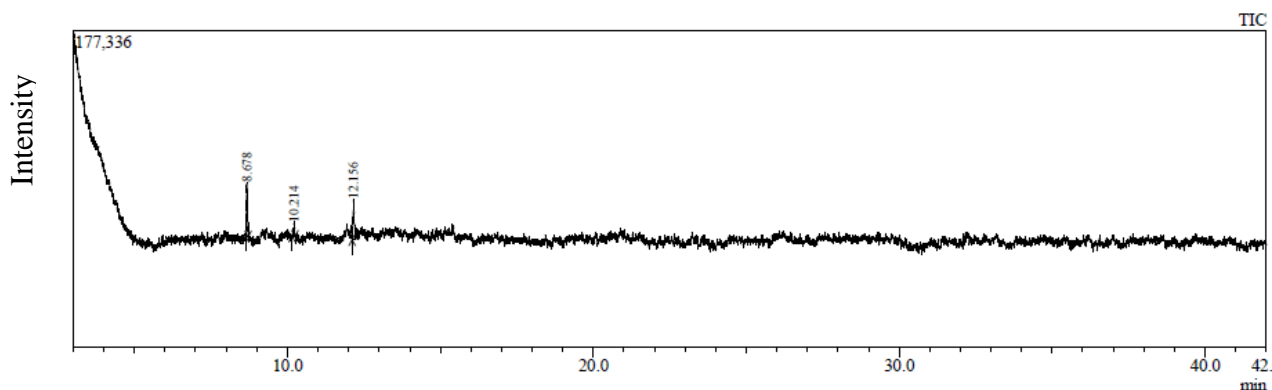


Рис. 3.12 Хроматограма мазі, розчиненої в хлороформі (аналіз методом ГХ-ПФА)

Серед них виділений  $\alpha$ -пінен (47.84 %) з часом утримування 8.68 хв, що пояснюється його високим вмістом в обох настоянках. Другою виявленою сполукою є 1,8-цинеол (40.85 %) з часом утримування 12.16 хв, а третьою –  $\beta$ -пінен (11.30 %) з часом утримування 10.21 хв [32, 33].

Хроматограми, отримані після аналізу обох зразків мазі (рис. 3.11 та рис. 3.12) свідчать про перевагу використання хлороформу як розчинника, оскільки на другій хроматограмі виявлено три сполуки-маркери.

Проведений аналіз дозволяє рекомендувати використовувати  $\alpha$ -пінен,  $\beta$ -пінен та 1,8-цинеол як маркери при наступних дослідженнях стабільності мазі методом ГХ-ПФА за величиною площі їх піку. На хроматограмі хлороформного аналізу мазі не виявляється лише  $\alpha$ -феландрен, який є основною сполукою в настоянці календули, а в іншій настоянці характеризується досить низьким вмістом. Однак, не може бути використаний як маркер при дослідженнях якості та стабільності мазі. Крім цього, мінорні сполуки, виявлені при ГХ-ПФА настоянки евкالیпту, не виявляються на хроматограмах аналізу обох зразків мазі, що пояснюється низькою їх концентрацією в настоянці та мазі.

### 3.6 Розробка методики ГХ-МС аналізу мазі з настоянками календули та евкаліпту для вивчення її стабільності

Крім ГХ-ПФА, який може бути використаний для швидкого аналізу мазі, великий інтерес викликає застосування з даною метою методу ГХ-МС. Метод також дозволяє ідентифікувати леткі компоненти настоянок та визначити зміну їх складу та концентрації в процесі зберігання мазі за величиною площі піку.

Проаналізувавши запропоновані методики аналізу ефірної олії календули та евкаліпту нами був розроблений метод ГХ-МС з режимом ін'єкції splitless, оскільки до складу мазі компоненти настоянок входять у невеликих концентраціях. Як стандарти в ході аналізу були використані настоянки календули та евкаліпту, які входять до складу мазі [103].

*Методика проведення аналізу:* 0.50 г мазі розчиняють в хлороформі в колбі на 50.0 мл, розчин фільтрують через фільтр Q-MAX RR Syringe Filters (діаметр фільтру 25 мм, мембрана 0,22  $\mu\text{m}$  PTFE Hydrophobic) у віали. Як стандарти використовують настоянки календули та евкаліпту, які входять до складу мазі.

*Умови хроматографування:* швидкість потоку в колонці 1.22 мл/хв, температура ін'єкції 270  $^{\circ}\text{C}$ , температура колонки 50  $^{\circ}\text{C}$ , режими ін'єкцій: splitless, час відбору проб 1.5 хв (для аналізу мазі) та спліт 1:50 (для аналізу настоянок), газ-носії гелій. Програма температурного режиму: початкова температура 50  $^{\circ}\text{C}$  (утримується 5 хвилин), зі швидкістю 5  $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ . температура зростає до 200  $^{\circ}\text{C}$  (утримується 8 хвилин) зі швидкістю 40  $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ . температура зростає до 310  $^{\circ}\text{C}$  (утримується 6 хвилин). Загальний час аналізу – 43 хвилини.

Для визначення можливих маркерів для вивчення стабільності мазі спочатку був проведений аналіз настоянок розробленим методом, але з використанням режиму ін'єкції split.

В результаті аналізу спиртової настоянки календули (рис. 3.13, табл. 3.15) ідентифіковано шістнадцять біологічно активних речовин.

Основними серед них визначено шість сполук:  $\alpha$ -кадінол,  $\delta$ -кадінен, t-мууролол,  $\gamma$ -кадінен, вірідифлорен та  $\alpha$ -мууролен [103]. Отримані результати

співпадають з даними проведених раніше досліджень по компонентному складу олії календули. В різних дослідженнях в ньому були виділені  $\alpha$ -кадінол, t-кадінол [55, 104, 115],  $\alpha$ -туйон [67, 104, 115],  $\alpha$ -мууролен,  $\gamma$ -мууролен [55, 115],  $\gamma$ -кадінен,  $\delta$ -кадінен,  $\alpha$ -кадінен [67, 87], вірідіфлорол,  $\beta$ -кубебен [55, 87], епі- $\alpha$ -мууролол,  $\beta$ -каріофілен [67],  $\alpha$ -гумулен [55].

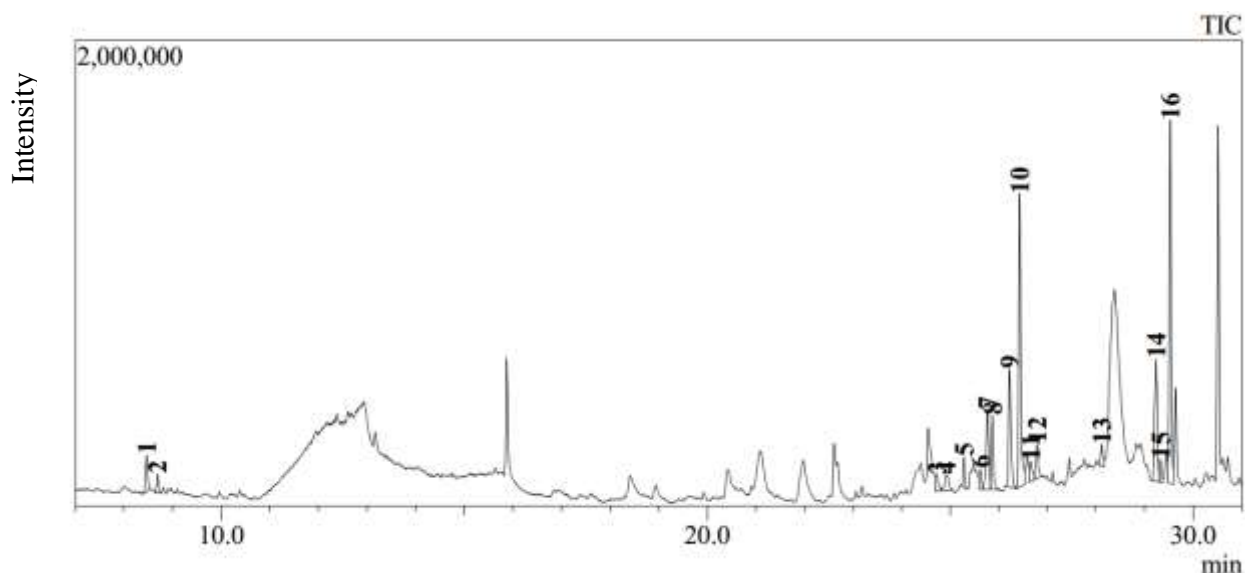


Рис. 3.13 Хроматограма спиртової настойки календули (аналіз методом ГХ-МС)

Таблиця 3.15

### Компоненти легкої фракції спиртової настойки календули

Назва сполуки	$t_R$ (хв)	Площа (%)	Площа
1 - $\alpha$ -туйон	8.46	2.76	427188
2 - $\alpha$ -пінен	8.69	1.25	193327
3 - $\alpha$ -гумулен	24.72	1.67	258717
4 - 9-епі-(E)-каріофілен	24.92	2.33	361120
5 - $\gamma$ -мууролен	25.28	1.83	283651
6 - $\alpha$ -гуайєн	25.62	1.57	242311
<b>7 - вірідіфлорен</b>	<b>25.78</b>	<b>7.53</b>	<b>1165951</b>
<b>8 - <math>\alpha</math>-мууролен</b>	<b>25.87</b>	<b>5.09</b>	<b>787148</b>
<b>9 - <math>\gamma</math>-кадінен</b>	<b>26.22</b>	<b>9.81</b>	<b>1518103</b>

<b>10 - <math>\delta</math>-кадінен</b>	<b>26.43</b>	<b>21.49</b>	<b>3326239</b>
11 - кубебен	26.66	2.00	309126
12 - $\alpha$ -кадінен	26.79	3.00	464355
13 - вірідіфлорол	28.12	1.74	269380
<b>14 - t-мууролол</b>	<b>29.24</b>	<b>11.32</b>	<b>1752491</b>
15 - $\alpha$ -мууролол	29.33	1.58	244122
<b>16 - <math>\alpha</math>-кадінол</b>	<b>29.53</b>	<b>25.03</b>	<b>3873077</b>

Результати аналізу спиртової настойки евкаліпту (рис. 3.14, табл. 3.16) показали наявність дев'ятнадцяти біологічно активних речовин.

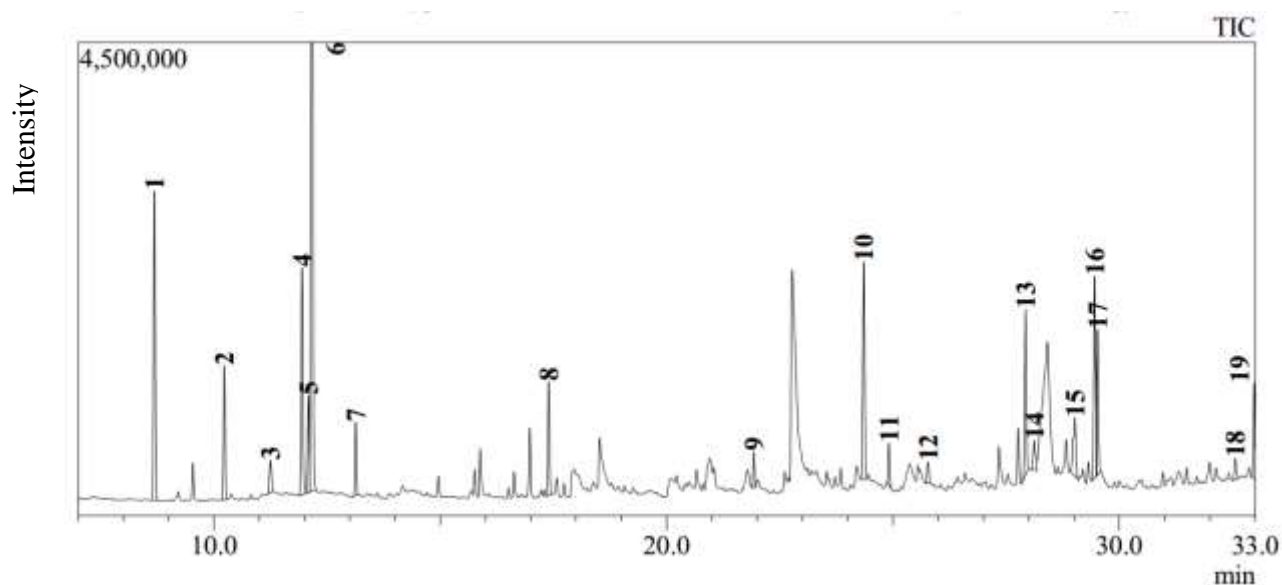


Рис. 3.14 Хроматограма спиртової настойки евкаліпту (аналіз методом ГХ-МС)

Таблиця 3.16

#### Компоненти легкої фракції спиртової настойки евкаліпту

Назва сполуки	$t_R$ (хв.)	Площа (%)	Площа
<b>1- <math>\alpha</math>-пінен</b>	<b>8.687</b>	<b>10.26</b>	<b>7504396</b>
<b>2 - <math>\beta</math>-пінен</b>	<b>10.231</b>	<b>4.37</b>	<b>3199678</b>
3 - $\alpha$ -феландрен	11.247	1.33	970746

<b>4 - <math>\rho</math>-цимен</b>	<b>11.946</b>	<b>7.39</b>	<b>5410686</b>
5 - D-лимонен	12.090	3.01	2201772
<b>6 - 1,8-цинеол</b>	<b>12.165</b>	<b>30.85</b>	<b>22574409</b>
7 - $\gamma$ -терпінен	13.134	2.19	1604419
8 - L- $\alpha$ -терпінеол	17.394	3.65	2667401
9 - $\alpha$ -терпінілацетат	21.927	1.05	767749
<b>10 - аромандендрен</b>	<b>24.353</b>	<b>7.47</b>	<b>5469337</b>
11 - 9-епі-(E)-каріофілен	24.912	1.30	950523
12 - $\gamma$ -гур'юнен	25.772	0.82	601759
<b>13 - (-)-глобулол</b>	<b>27.928</b>	<b>5.93</b>	<b>4341302</b>
14 - вірідифлорол	28.118	1.25	915625
15 - $\gamma$ -еудесмол	29.019	3.12	2279532
<b>16 - <math>\beta</math>-еудесмол</b>	<b>29.457</b>	<b>6.94</b>	<b>5075496</b>
<b>17 - <math>\alpha</math>-еудесмол</b>	<b>29.521</b>	<b>4.86</b>	<b>3559571</b>
18 - $\alpha$ -феландрен димер	32.561	0.84	616492
19 - криптомеридіол	32.981	3.36	2459017

Основним компонентом олії є 1,8-цинеол (30.85 %). Крім нього як маркери були виділені сім речовин:  $\alpha$ -пінен, аромандендрен,  $\rho$ -цимен,  $\beta$ -еудесмол, (-)-глобулол,  $\alpha$ -еудесмол,  $\beta$ -пінен [103].

Отримані результати співпадають з іншими дослідженнями, проведеними різними вченими по вивченню компонентного складу ефірної олії евкаліпту. Ними при аналізі олії або настойки евкаліпту були виділені  $\alpha$ -пінен [60, 62, 66, 108, 146],  $\beta$ -пінен, 1,8-цинеол [60, 62, 63, 66, 108, 146], лимонен [60, 66], цимен [60, 63, 66, 146], глобулол,  $\alpha$ -терпінеол [62, 63, 66, 146],  $\alpha$ -феландрен,  $\gamma$ -терпінен,  $\alpha$ -терпінеол [60, 63],  $\alpha$ -терпінілацетат,  $\alpha$ -гур'юнен, вірідифлорол, (-)-глобулол [63].

Після цього для визначення вмісту компонентів рослинного походження був проведений аналіз мазі, розчиненої в хлороформі (рис. 3.15). Розчинник був

вибраний з огляду на попередньо проведені дослідження при здійсненні ПФА мазі.

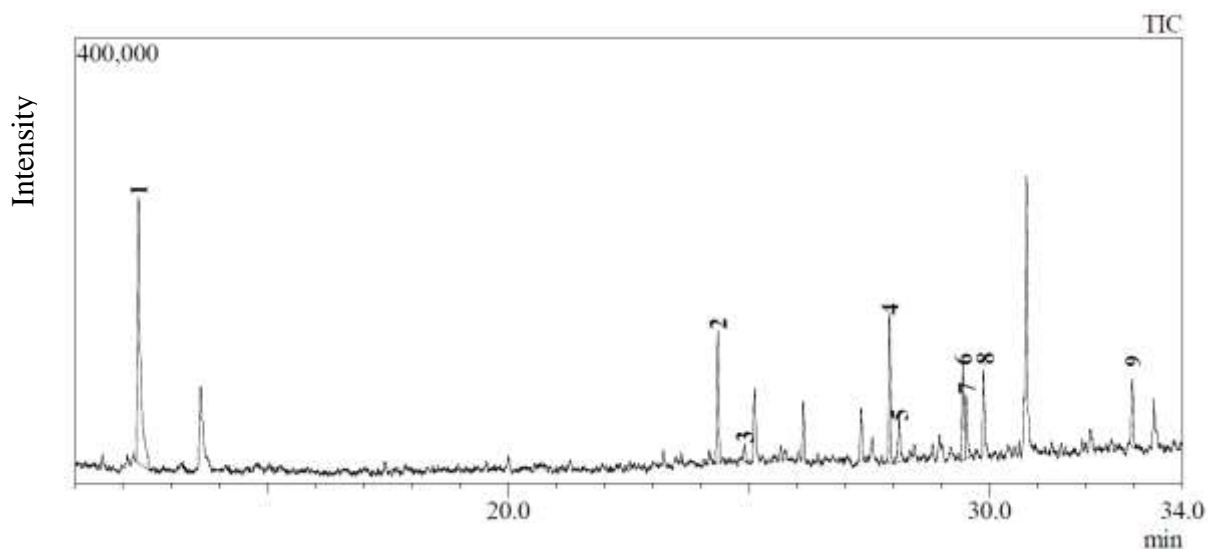


Рис. 3.15 Хроматограма хлороформного розчину мазі (аналіз методом ГХ-МС)

Серед рослинних компонентів були ідентифіковані дев'ять сполук, які можуть бути використані як маркери в аналізі якості мазі (табл. 3.17). При цьому 1,8-цинеол, аромандендрен, (-)-глобулол,  $\beta$ -еудесмол,  $\alpha$ -еудесмол та криптомеридіол є компонентами ефірної олії настойки евкаліпту;  $\alpha$ -кадінол є компонентом ефірної олії настойки календули, а 9-епі-(E)-каріофілен та вірідіфлорол є складовими компонентами ефірних олій обох рослин. Найбільшим вмістом серед ідентифікованих сполук характеризуються 1,8-цинеол, (-)-глобулол та аромандендрен.

Таблиця 3.17

#### Компоненти легкої фракції хлороформного розчину мазі

Назва сполуки	$t_R$ (хв)	Площа (%)	Площа
1 - 1,8-цинеол	12.32	41.76	877218
2 - аромандендрен	24.36	12.46	261810
3 - 9-епі-(E)-каріофілен	24.92	1.76	36927
4 - (-)-глобулол	27.93	14.03	294686

7 - $\alpha$ -еудесмол	29.52	7.07	148427
8 - $\alpha$ -кадінол	29.54	14.63	199608
9 - криптомеридіол	32.97	7.68	161363
5 - вірідіфлорол	28.12	5.50	115610
6 - $\beta$ -еудесмол	29.45	9.73	204341

На рис. 3.16 наведені формули речовин, які були визначені з використанням розробленого методу ГХ-МС в мазі.

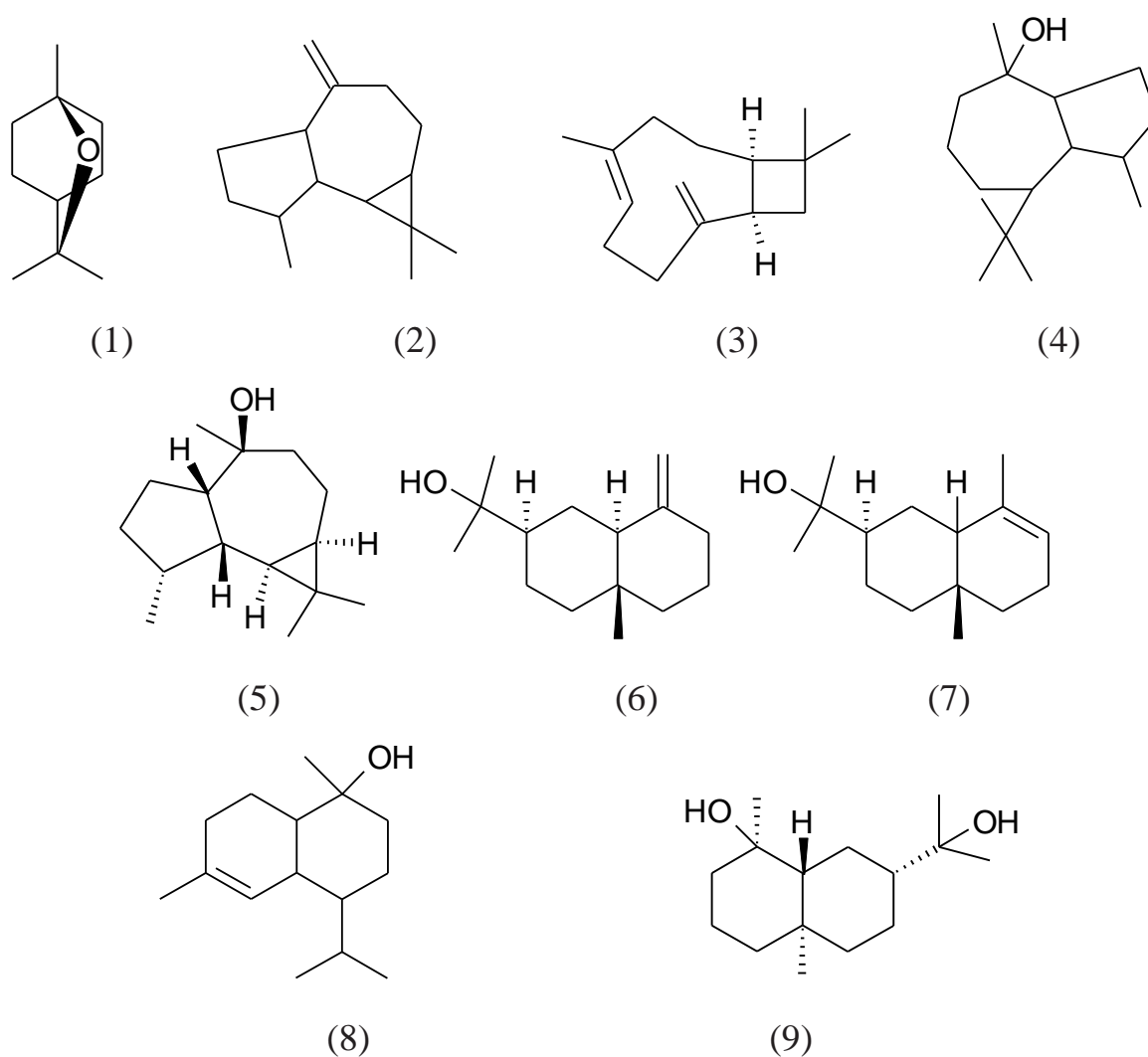


Рис. 3.16 Хімічна структура сполук, ідентифікованих методом ГХ-МС в мазі з настоянками календули та евкаліпту: (1) 1,8-цинеол, (2) аромандендрен, (3) 9-епі-(Е)-каріофілен, (4) (-)-глобулол, (5) вірідіфлорол, (6)  $\beta$ -еудесмол, (7)  $\alpha$ -еудесмол, (8)  $\alpha$ -кадінол, (9) криптомеридіол



Розроблений метод був застосований в аналізі стабільності досліджуваної мазі за зміною величин площ піків рослинних компонентів. Перевагою використання такого методу є невеликі затрати часу на пробопідготовку та швидке проведення аналізу. Після відкриття упаковки мазь зберігалась за температури  $5\pm 3$  °C протягом 18 днів. Після цього був проведений повторний аналіз розробленим методом ГХ-МС (рис. 3.17). На наведеному рисунку під номером 1 наведені результати аналізу свіжовиготовленої мазі, а під номером 2 – результати аналізу мазі через 18 днів зберігання.

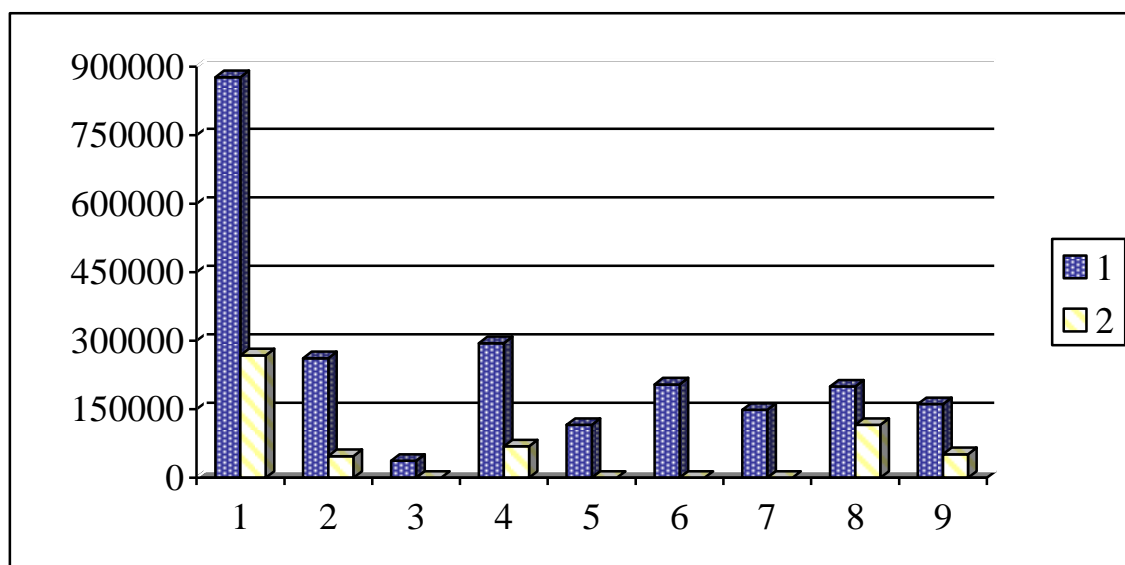


Рис. 3.17 1- 1,8-цинеол; 2- аромандендрен; 3- 9-епі-(E)-каріофілен; 4-(-)-глобулол; 5- вірідифлорол; 6- β-еудесмол; 7- α-еудесмол; 8- α-кадінол; 9- криптомеридіол

Отримані результати свідчать про зниження концентрації основних діючих речовин олій обох настоек в мазі через 18 днів. Деякі компоненти (9-епі-(E)-каріофілен, вірідифлорол, β-еудесмол, α-еудесмол) в ній не були ідентифіковані. Отримані результати свідчать про можливість використання розробленого методу ГХ-МС для аналізу стабільності мазі в процесі її зберігання [147].

Одним із компонентів досліджуваної мазі є димексид. Перевагами його застосування в складі мазі є здатність покращувати транспорт інших речовин через шкіру та протизапальний, анальгезуючий і бактеріостатичний ефект [163].

Монографія “Диметилсульфоксид” (ДМСО) ДФУ [7] не регламентує проведення його кількісного визначення. Вона містить рекомендації по визначенню в ньому домішок методом ГХ-ПД. При проведенні досліджень було встановлено, що розроблений метод ГХ-МС дозволяє провести визначення вмісту ДМСО в складі досліджуваної мазі при вивченні її якості та стабільності. Час утримування ДМСО при проведенні аналізу склав 6.22 хв (рис. 3.18).

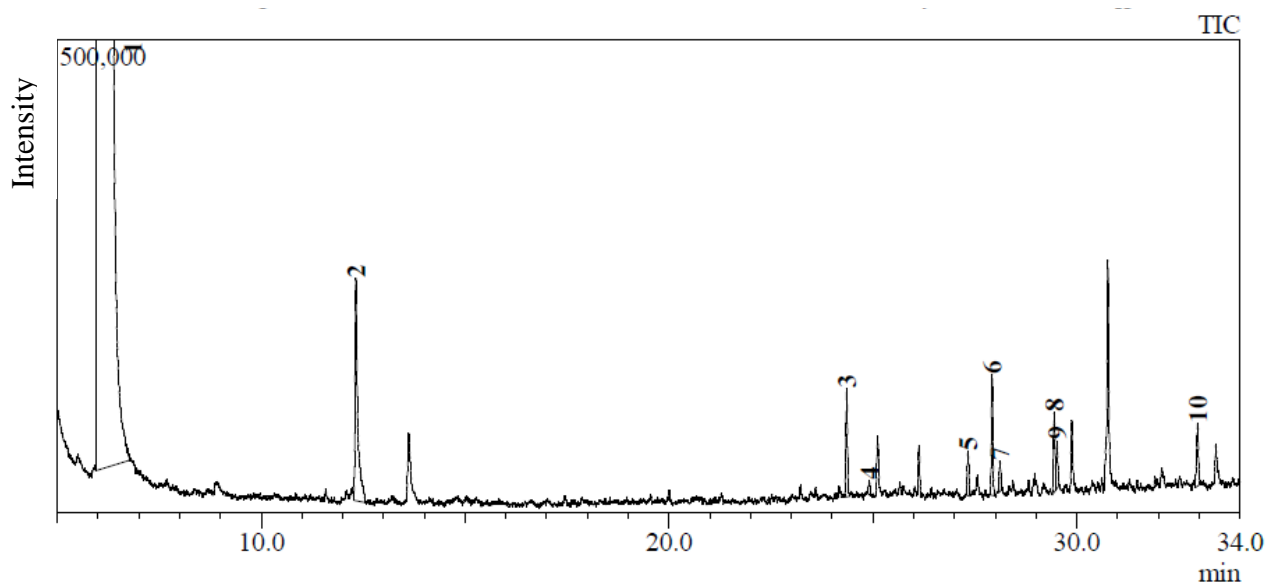


Рис. 3.18 Хроматограма хлороформного розчину мазі (аналіз методом ГХ-МС з піком ДМСО)

У свіжовиготовленій мазі площа піку ДМСО склала 63411159 (98.28 %), а у мазі через 18 днів зберігання 97117107 (97.88 %). Отримані результати свідчать про незначне зменшення концентрації ДМСО в мазі через 18 днів зберігання за температури  $5 \pm 3$  °С. Таким чином, даний метод дозволяє визначити вміст ДМСО в мазі.

### 3.7 Оцінка мікробіологічної чистоти мазі з настоянками евкаліпту та календули

Перед проведенням дослідження було проведено перевірку придатності обраної методики визначення мікробіологічної чистоти мазі (розділ 2). В процесі

дослідження визначали число мікроорганізмів в зразку лікарського засобу та порівнювали його з числом мікроорганізмів в контрольному досліді (табл. 3.18).

Таблиця 3.18

**Результати перевірки придатності методики визначення загального числа аеробних мікроорганізмів**

Середнє число КУО в 1 г зразка					
<i>S. aureus</i> ATCC 6538		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	
дослід	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль
Соево-казеїновий агар					
92	98	96	110	98	92

Отримані значення середнього числа КУО/г свідчать, що досліджуваний зразок мазі в розведенні 1:10 не виявляє протимікробної дії по відношенню до *St. aureus* ATCC 6538, *Ps. aeruginosa* ATCC 9027, *B. subtilis* ATCC 6633, оскільки ні в одному з випробувань не спостерігалось зниження числа мікроорганізмів більше, ніж в два рази [19].

Після цього перевіряли придатність методики визначення загального числа дріжджових та плісневих грибів, а саме *C. albicans* та *A. brasiliensis* (табл. 3.19).

Таблиця 3.19

**Результати перевірки придатності методики визначення загального числа дріжджових та плісневих грибів**

Середнє число КУО в 1 г зразка			
<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	
дослід	контроль	дослід	контроль
Сабуру-декстрозний агар			
92	96	96	108

Отримані результати показали, що зразок мазі в розведенні 1:10 не виявляє пригнічувальної дії на життєздатність обох грибів. Крім цього, негативний

контрольний дослід показав відсутність зростання мікроорганізмів на живильному середовищі. Таким чином, дана методика може бути використана для оцінки мікробіологічної чистоти досліджуваної мазі.

Дослідження мікробіологічної чистоти мазі проводили двома методами: глибинного висівання (5-2-2-1, європейська та національна частина статті 2.6.12. ДФУ) та двошарового висівання (5-2-2-3, національна частина статті 2.6.12. ДФУ) (методики наведені в розділі 2). В процесі дослідження використовували метод підрахунку на чашках Петрі (табл. 3.20) [14].

При оцінці мікробіологічної чистоти мазі обома методами у свіжовиготовлених зразках мазі та через 30 днів зберігання за температури  $5 \pm 3$  °C кількість аеробних мікроорганізмів та дріжджових і плісневих грибів становить до 10 КУО/г. Інкубація зразків мазі на манітно-сольовому та цетримідному агарях показала відсутність бактерій *St. aureus* та *Ps. aeruginosa*. Таким чином, мазь відповідає вимогам статті 5.1.4. “Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів та субстанцій для фармацевтичного застосування” ДФУ, оскільки число мікроорганізмів та грибів залишається у встановлених межах [14, 19, 147].

Таблиця 3.20

**Результати оцінки мікробіологічної чистоти мазі з настоянками календули та евкالیпту**

Метод глибинного висівання		Метод двошарового висівання		Мікроорганізми	
Кількість КУО/г				<i>St. aureus</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>
ТАМС	ТУМС	ТАМС	ТУМС		
свіжовиготовлений зразок					
до 10	до 10	до 10	до 10	-	-
через 10 діб зберігання					
до 10	до 10	до 10	до 10	-	-

через 20 діб зберігання					
до 10	до 10	до 10	до 10	-	-
через 30 діб зберігання					
до 10	до 10	до 10	до 10	-	-

«-» означає повну відсутність бактерій у зразку.

### Висновки до розділу 3

1. Вперше розроблені методики ГХ для контролю якості і вивчення стабільності мазей аптечного виготовлення з настоянками евкаліпту та календули.

2. Запропонований метод ГХ-МС для вивчення стабільності мазі з настоянкою евкаліпту. Виділено шість сполук-маркерів для подальших досліджень з можливості продовження терміну придатності мазі.

2. Розроблена та валідована методика кількісного визначення 1,8-цинеолу в мазі з настоянкою евкаліпту методом ГХ-ПІД. Розраховані параметри придатності системи для аналізу відповідають встановленим критеріям. Визначені МВ 1,8-цинеолу –  $3.76 \times 10^{-8}$  г/мл і МКВ –  $1.14 \times 10^{-7}$  г/мл свідчать про достатню чутливість методики. Залишкове стандартне відхилення ( $S_0=1.71 < 1.77$ ), коефіцієнт кореляції методики ( $r=0.9999 \geq 0.9916$ ), систематична похибка ( $\delta=0.94 \leq 1.02$ ) та однобічний довірчий інтервал ( $\Delta_Z=0.72 \leq 3.20$ ) відповідають встановленим критеріям.

3. Розробленим методом ГХ-ПІД проведений аналіз мазі з настоянкою евкаліпту. Параметри збіжності результатів аналізу (RSD, %=0.68 < 1.92) та значення хроматографічних параметрів відповідають встановленим вимогам, що свідчить про можливість використання методики для вивчення стабільності мазі.

4. Протягом місяця визначені структурно-механічні властивості мазі з настоянкою евкаліпту. Значення механічної стабільності мазі знаходиться в межах 1.44, обидва коефіцієнти динамічного розрідження відповідають вимогам та суттєво не змінюються протягом 30 днів, як і значення структурної в'язкості.

Отримані результати дозволяють зробити висновок про збереження реологічних властивостей мазі.

5. Запропонований метод ГХ-ПФА мазі з настоянками календули та евкالیпту. Як оптимальний розчинник в процесі дослідження обрано хлороформ. В результаті аналізу  $\alpha$ -пінен,  $\beta$ -пінен та 1,8-цинеол рекомендовано використовувати як маркери для вивчення стабільності мазі.

6. Розроблено метод ГХ-МС для контролю якості і вивчення стабільності мазі з настоянками календули та евкالیпту. В процесі аналізу визначені сполуки-маркери обох настоянок та хлороформного розчину мазі. Для вивчення стабільності мазі запропоновано використовувати дев'ять сполук-маркерів рослинного походження: 1,8-цинеол, аромандендрен, (-)-глобулол,  $\beta$ -еудесмол,  $\alpha$ -еудесмол, криптомеридіол,  $\alpha$ -кадінол, 9-епі-(E)-каріофілен та вірідіфлорол.

7. Проведений аналіз мазі з настоянками календули та евкالیпту методом ГХ-МС при її зберіганні протягом 18 днів за температури  $5 \pm 3$  °C показав зниження концентрації компонентів-маркерів, що свідчить про можливість використання методики для оцінки стабільності мазі за площею піка сполук-маркерів.

8. Проведена оцінка мікробіологічної чистоти обох мазей протягом місяця методами двошарового висівання (для обох мазей) та методом глибинного висівання (для мазі з настоянками календули та евкالیпту). Отримані результати свідчать про відсутність бактерій *St. aureus* та *Ps. aeruginosa*. Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів (ТАМС) та дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) не перевищує допустимі межі в обох випадках.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

1. Савченко Л. П., Умінська К. А., Георгіянц В. А. Використання методу Headspace для експрес-аналізу екстемпоральної мазі з настоянками календули та евкالیпту. *Зб. наук. праць співробіт. НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2017. Вип. 28. С. 115-122 (Особистий внесок – брала участь в

проведенні експериментальних досліджень, узагальненні і обробці результатів та підготовці статті).

2. Identification of Calendula and Eucalyptus alcoholic tinctures volatile compounds in the compounding ointment by Gas chromatography-mass spectrometry. Lesia P. Savchenko, Liudas Ivanauskas, Kateryna A. Uminska, Victoriya A. Georgiyants. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2018. Vol. 12 (1), Suppl. Issue. P. 145-150 (Особистий внесок – брала участь в узагальненні і обробці результатів та підготовці статті).
3. Контроль мікробіологічної чистоти мазей аптечного виготовлення як гарантія їх безпеки та якості / Л. П. Савченко, К. А. Умінська, В. О. Вракін, В. А. Георгіянц, О. П. Стрілець. *Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку*: мат. І науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю, Харків, 24-25 березня 2016 р. Харків, 2016. С. 169-170.
4. Екстемпоральні мазі: аналіз якості за сучасними вимогами / Л. П. Савченко, К. А. Умінська, В. О. Вракін, В. А. Георгіянц. *Фармація XXI століття: тенденції та перспективи*: мат. VIII Національного з'їзду фармацевтів України, Харків, 13-16 вересня 2016 р. У 2 т., Т. 1., Харків, Вид-во НФаУ, 2016. С. 210.
5. Stability studies of compounding ointment with herbal tinctures / L. P. Savchenko, K. A. Uminska, V. A. Georgiyants, L. Ivanauskas. "Science and practice 2016": the 7<sup>th</sup> International Pharmaceutical Conference, Kaunas, Lithuania, 20-21 October, 2016. Kaunas, 2016. P. 43-44.
6. Савченко Л. П., Уминская Е. А., Георгіянц В. А. Headspace аналіз в дослідженні екстемпоральної мазі с рослинними настоянками. *Медичні науки: напрямки та тенденції розвитку в Україні та світі*: мат. міжнародної науково-практичної конференції, Одеса, 16-17 червня 2017 р. Одеса, ГО "Південна фундація медицини", 2017. С. 20-21.
7. Studying of the compounding ointment with Eucalyptus tincture rheological parameters / L. P. Savchenko, K. A. Uminska, G. P. Kukhtenko, V. A.

Georgiyants. *Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice: the 8<sup>th</sup> International Conference*, Kaunas, Lithuania, 15 December, 2017. Kaunas, 2017. P. 28-29.

8. Использование метода газовой хроматографии с масс-детектором для изучения стабильности экстерпоральных мазей / Л. П. Савченко, Е. А. Уминская, В. А. Георгиянц, Л. Иванаускас, Н. Б. Саидов. *Наука и инновация*. 2017. № 3. С. 36-38.
9. Development and validation of the GC method for the chemical stability estimation of the compounding ointment with Eucalyptus tincture / V. Georgiyants, L. Savchenko, K. Uminska, L. Ivanauskas. *ChemCYS 2018: Chemistry Conference for Young Scientists*, Blankenberge, Belgium, 21-23 February 2018. Blankenberge, 2018. P. 63.



## РОЗДІЛ 4

# ВИБІР ТА РОЗРОБКА МЕТОДИК ІДЕНТИФІКАЦІЇ І КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АФІ МАЗІ СИМАНОВСЬКОГО. ОЦІНКА ЇЇ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЧИСТОТИ ТА ЗБЕРЕЖЕННЯ РЕОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ

АФІ мазі Симановського є фенілефрину гідрохлорид, цинку оксид та ментол.

Фенілефрину гідрохлорид (2.1) – синтетичний замінник адреналіну, який має судинозвужувальну та  $\alpha$ -адреноміметичну дію [113, 161]. Він входить до складу очних крапель, розчинів для ін'єкцій, назальних крапель, порошоків для приготування розчинів і таблеток для лікування простудних захворювань, ректальних мазей [113, 138, 161]. Найчастіше його вводять до складу протизастудних препаратів як назальний деконгестант, який діє шляхом вазоконстрикції, зменшуючи набряк і гіперемію слизової оболонки носа [49, 69, 111, 138, 155, 162]. Цинку оксид має в'язучу, адсорбуючу, підсушувальну, антисептичну дію та зменшує вираженість ексудативних процесів [41]. Входить він до складу мазей та присипок, які зменшують подразнення шкіри. Поєднання властивостей даних компонентів з ментолом обумовлює успішне застосування мазі Симановського при захворюваннях верхніх дихальних шляхів.

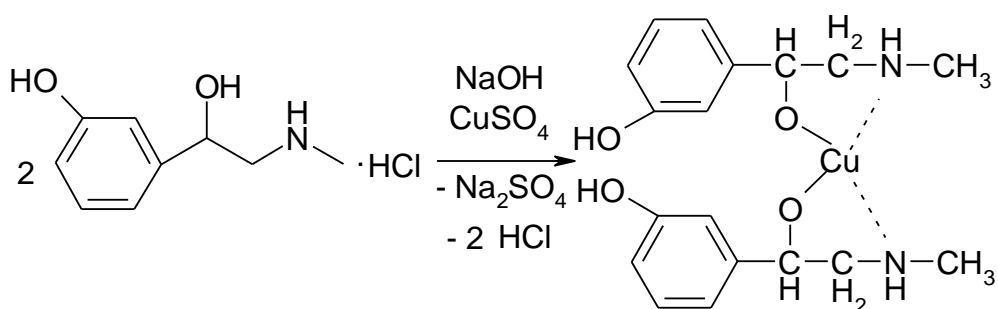
Мазь Симановського – це мазь жовтуватого кольору, однорідна, без механічних включень, має характерний запах ментолу. В ході аналізу мазі була проведена ідентифікація та кількісне визначення її АФІ, а також дослідження її мікробіологічної чистоти та реологічних параметрів.

### 4.1. Вибір методик ідентифікації АФІ мазі

Особливістю проведення аналізу МЛФ є вибір оптимальних розчинників, які б дозволяли провести повну екстракцію АФІ з маzewої основи. Ідентифікацію фенілефрину гідрохлориду можна проводити за декількома реакціями. За

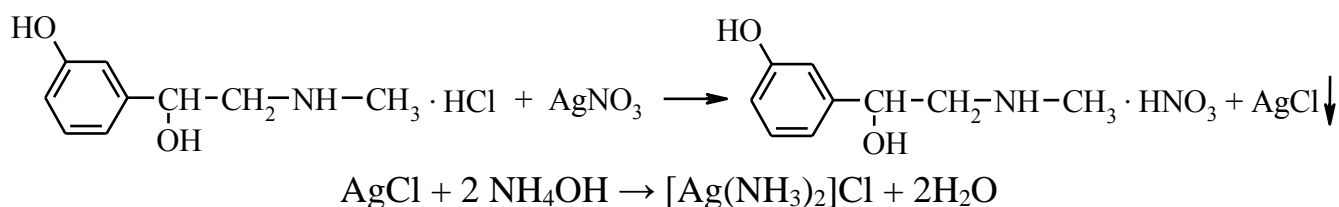
вимогами ДФУ субстанція повинна витримувати вимоги щодо показника питомого оптичного обертання, температури плавлення та за абсорбційною спектрофотометрією в інфрачервоній області [7]. Крім цього ДФУ рекомендує проводити ідентифікацію фенілефрину гідрохлориду за взаємодією з міді (II) сульфату розчином в присутності натрію гідроксиду розчину (схема 4.1) з утворенням комплексу синьо-фіолетового кольору, який не розчиняється в ефірі. Оскільки в даній реакції використовується ефір, який є прекурсором, від її використання довелось відмовитись.

Схема 4.1



Наявність залишку кислоти хлористоводневої доводили реакцією на хлориди (схема 4.2).

Схема 4.2



*Методика проведення.* До 0.1 г мазі додають 2 мл води Р і кип'ячать 1 хв. Після охолодження суміш фільтрують. До 3-5 крапель фільтрату додають 2-3 краплі азотної кислоти розведеної Р і 2-3 краплі срібла нітрату розчину Р<sub>1</sub>, перемішують і відстоюють. Утворюється білий сирнистий осад, який розчиняється при додаванні надлишку аміаку розчину Р [31].

Оскільки для кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду обрано метод абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області, його ідентифікацію рекомендовано проводити також за УФ-спектром. Такий підхід дозволить

зеконотити час аналїзу, оскїлки, як для ідентифїкації, так і для кїлькїсного визначення буде використотуватись один і той же випроботуваний розчин.

*Методика проведення.*

*Випроботуваний розчин.* Використотують випроботуваний розчин, вигототвлений для кїлькїсного визначення.

*Розчин порівняння.* Використотують розчин порівняння, вигототвлений для кїлькїсного визначення.

*Компенсацийний розчин.* 0.1 М розчин хлористотводневої кислоти [31].

Спектральна область: від 220 нм до 300 нм.

Ультрафіолетовий спектр поглинання випроботуваното розчину повинен мати максимум за тієї самої довжини хвилі, що і розчин порівняння. Абсорбційний максимум: 273 нм (рис. 4.1).

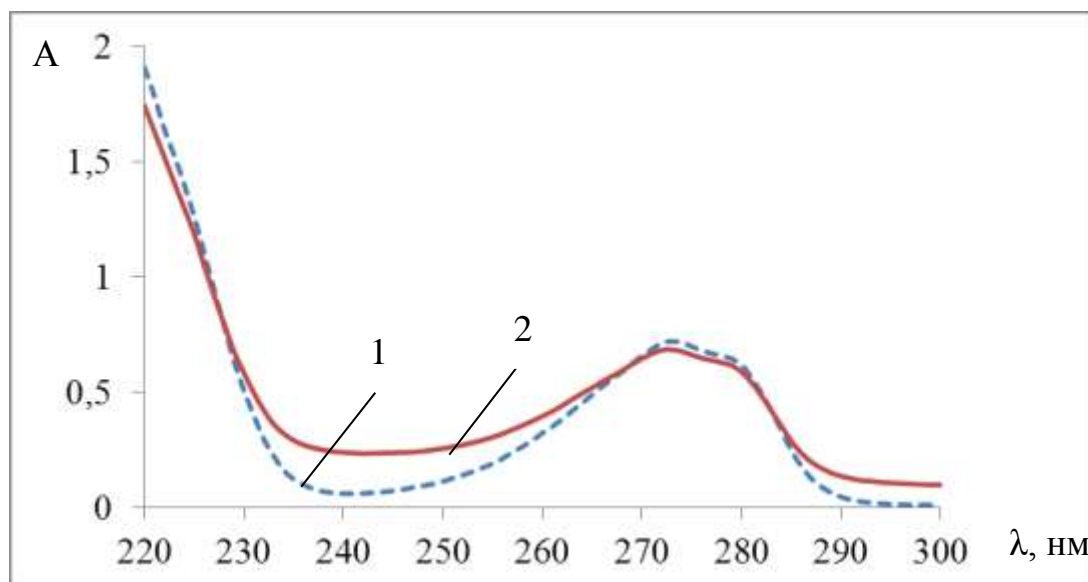
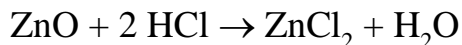


Рис. 4.1 Абсорбційні спектри поглинання розчинів: 1 – СЗ фенїлефрину гідрохлориду; 2 – екстракту з мазі у 0.1 М розчині хлористотводневої кислоти

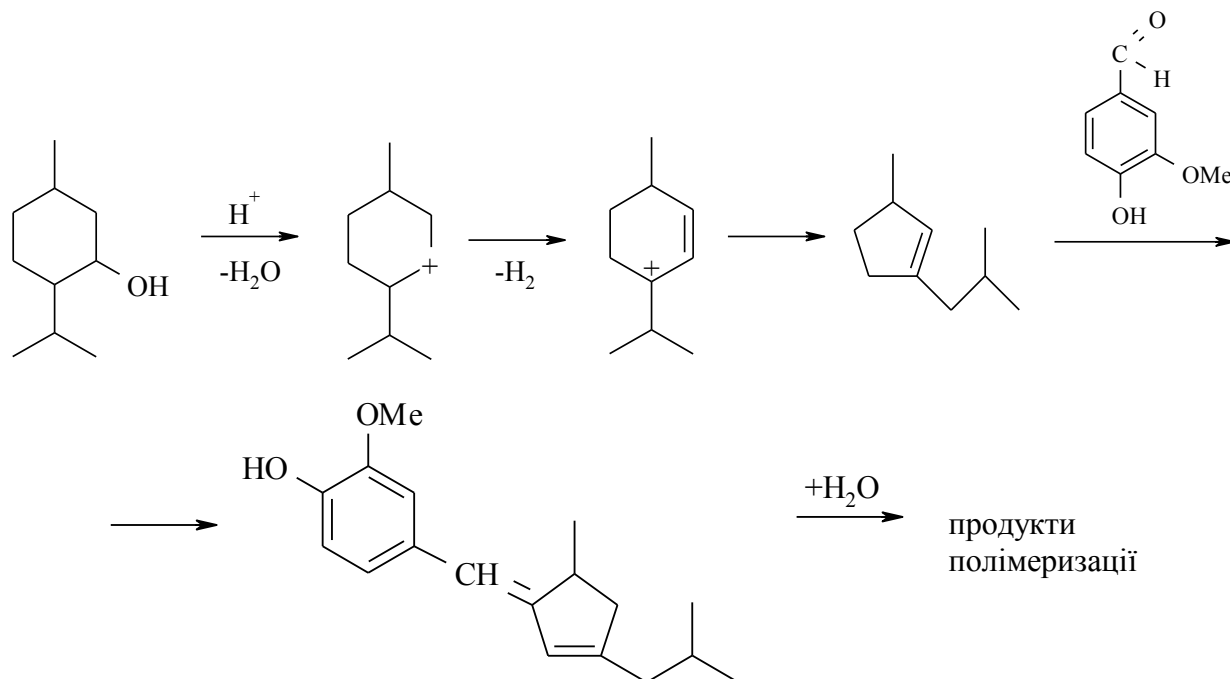
Ідентифїкацію цинку оксиду проводили за реакцією **б** на цинк (2.3.1) ДФУ [7, 8] (схема 4.3). Для вилучення цинку оксиду з мазевої основи використотували хлористотводневу кислоту розведену. У випадку використання для досліджень реакції **а** на цинк необхідно брати для аналїзу наважку мазі не меншу, ніж 5.0 г, що економїчно не вигідно.



*Методика проведення реакції.* До 0.1 г мазі додають 2 мл води, 3-5 крапель хлористоводневої кислоти розведеної Р і кип'ячать 1 хв. Після охолодження суміш фільтрують. До фільтрату додають 0.5 мл калію фероціаніду розчину Р. Поступово утворюється білий драглистий осад, нерозчинний у хлористоводневій кислоті розведеної Р [31].

Для ідентифікації ментолу ДФУ рекомендує використовувати ТШХ та хроматограми, отримані при визначенні супровідних домішок, а також повинні виконуватись вимоги щодо питомого оптичного обертання. Крім цього, запропоновано проводити визначення температури плавлення перекристалізованого ментолу [7]. Однак, дані реакції буде важко відтворити в умовах аптек. Тому для ідентифікації ментолу запропоновано використовувати реакцію з розчином ваніліну в сірчаній кислоті (схема 4.4) [21] та його специфічний запах.

Схема 4.4



*Методика проведення реакції.* Нагрівають 0.1 г мазі на водяній бані до розплавлення основи, додають 4-5 крапель розчину ваніліну в сірчаній кислоті Р і 2-3 краплі води Р. Утворюється червоне забарвлення [31].

#### 4.2 Розробка та валідація методики кількісного визначення ментолу

В більшості випадків для аналізу ЛФ з ментолом використовується колонка 30 м×0.25 мм×0.25 μм [73, 115, 130], довжина якої дозволяє провести розділення компонентів препарату. Тому нами в аналізі також була використана така колонка. В результаті аналізу існуючих методик кількісного визначення ментолу методом ГХ-ПІД був розроблений наступний метод його кількісного визначення в досліджуваній мазі. В процесі аналізу проходить зміна температурного режиму від початкової температури (50 °С) через температуру 60 °С до 310 °С. Програма температурного режиму була обрана з огляду на низьку температуру плавлення ментолу (34 °С), а подальше підвищення температури до 310 °С дозволить провести повне відділення ментолу від інших компонентів мазі. Оскільки ментол добре розчиняється в метанолі, він був обраний як розчинник для проведення екстракції, а використання ультразвукової бані дозволило провести повне вилучення досліджуваного компонента з мазі [34, 37, 76]. Оскільки ментол має леткі властивості, мірний стакан в процесі екстракції закривали поліетиленовою плівкою для попередження його випаровування.

*Умови хроматографування:* об'єм ін'єкції 1 μл, температура ін'єкції 260 °С, спосіб взяття ін'єкції – split (split-співвідношення 1:60), газ-носій – гелій, швидкість потоку в колонці 1,26 мл/хв, температура детектора 310 °С. Температурна програма: початкова температура 50 °С, нагрівання до 60 °С зі швидкістю 3 °С/хв, нагрівання до 310 °С зі швидкістю 25 °С/хв (утримується 5 хвилин). Загальний час аналізу – 18.33 хвилини.

*Приготування випробовуваного розчину:* 0.50 г мазі зважують в мірний стакан, додають 10 мл метанолу, закривають поліетиленовою плівкою та поміщають на ультразвукову баню при 30 °С на 15 хвилин. Процедуру

повторюють ще три рази обережно переносячи розчин в мірну колбу на 50.0 мл. Після закінчення екстракції розчин доводять до мітки 50.0 мл метанолом. Отриманий метанольний екстракт фільтрують через фільтр Q-MAX RR Syringe Filters (діаметр фільтру 25 мм, мембрана 0.22  $\mu\text{m}$  PTFE Hydrophobic) у віали.

*Приготування розчину порівняння:* 0.02 г ментолу розчиняють в мірній колбі на 100.0 мл в метанолі для отримання концентрації розчину  $2 \times 10^{-4}$  г/мл.

З використанням розробленого методу проведений аналіз метанольного екстракту з мазі. На отриманій хроматограмі (рис. 4.2) чітко видно пік ментолу (час утримування ментолу склав 8.00 хв) [76].

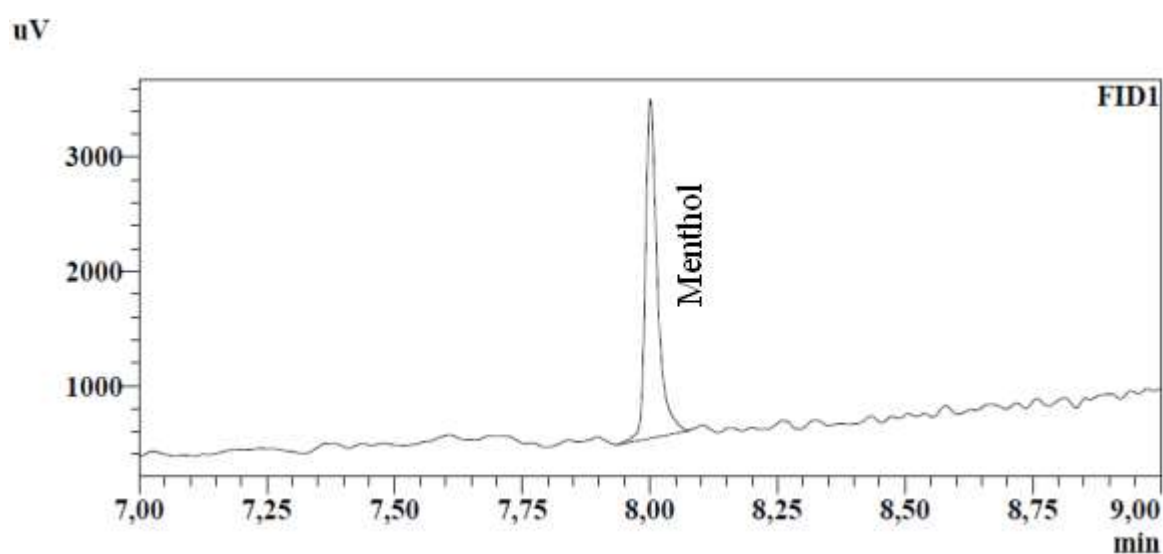


Рис. 4.2 Хроматограма метанольного екстракту мазі

Для доведення можливості використання методики в аналізі мазі були визначені параметри придатності хроматографічної системи за вимогами статті 2.2.46. “Методи хроматографічного розділення” ДФУ [8, 76]. Всі параметри були розраховані з використанням програмного забезпечення. В ході аналізу були визначені число теоретичних тарілок ( $N$ ), величина якого характеризує ефективність колонки, коефіцієнт симетрії ( $A_s$ ), фактор утримування ( $k$ ), який характеризує період утримування компоненту та не залежить від колонки і швидкості потоку, які використовуються для аналізу. Для характеристики збіжності результатів аналізу було розраховане значення відносного стандартного відхилення ( $S_r$ , %) для параметрів час утримування ( $t_R$ ), площа піку, висота піку

та кількісний вміст. Оцінка проводилась після чотирьох паралельних ін'єкцій метанольного екстракту мазі (табл. 4.1).

Максимальне розраховане значення відносного стандартного відхилення 1.60 % (для параметру висота піку) не перевищує максимальне допустиме значення, яке для чотирьох паралельних ін'єкцій складає 1.92 % з врахуванням допусків відхилення в кількісному вмісті  $\pm 10$  %. Значення коефіцієнту симетрії також знаходиться у встановлених межах (від 0.8 до 1.5). Отримані результати свідчать про придатність методики для кількісного визначення ментолу в мазі розробленим методом.

Таблиця 4.1

**Параметри придатності методики кількісного визначення ментолу методом ГХ-ПД**

<i>Назва параметру</i>	<i>Отримане значення</i>
$t_R$ , хв	8.00 ( $S_r=0.022$ %)
Площа піку	6022 ( $S_r=1.48$ %)
Висота піку	3725 ( $S_r=1.60$ %)
Кількісний вміст	0.04 ( $S_r=1.11$ %)
N	669286 ( $RSD=0.85$ %)
$A_s$	1.30 ( $RSD=0.43$ %)
k	3.66 ( $RSD=0.033$ %)

Після цього була проведена валідація розробленої методики згідно з встановленими вимогами [8]. Першим етапом був проведений прогноз невизначеності методики аналізу, який в даному випадку складається з невизначеності пробопідготовки (приготування випробовуваного розчину та розчину порівняння), а також невизначеності самого аналізу. Розрахунок невизначеності пробопідготовки проводили з врахуванням всіх етапів приготування випробовуваного розчину та розчину порівняння (табл. 4.2).

Отримане значення невизначеності пробопідготовки незначно перевищує допустимий критерій ( $\Delta_{SP,r} \leq 0.32 \times \max \Delta_{As} = 1.02 \%$ ), що, в свою чергу, підвищує вимоги до значення невизначеності кінцевої аналітичної операції ( $\Delta_{FAO,r}$ ). Її величина, як і у випадку спектрофотометричного визначення складає 0.75 %.

Таблиця 4.2

### Розрахунок невизначеності пробопідготовки

Операція пробопідготовки	Невизначеність, %
<i>Розчин порівняння</i>	
Зважування ментолу на аналітичних вагах	$0.0002/0.02 \times 100 = 1$
Розведення в мірній колбі на 100.0 мл	0.12
Невизначеність приготування розчину порівняння	$\Delta_{SP}^{st} = \sqrt{1^2 + 0.12^2} = 1.42$
<i>Випробовуваний розчин</i>	
Зважування мазі на аналітичних вагах	$0.0002/0.5 \times 100 = 0.04$
Розведення в мірній колбі на 50.0 мл	0.12
Невизначеність приготування випробуваного розчину	$\Delta_{SP} = \sqrt{0.04^2 + 0.12^2} = 0.13$
Загальна невизначеність пробопідготовки ( $\Delta_{SP,r}$ )	$\Delta_{SP,r} = \sqrt{1.42^2 + 0.13^2} = 1.43$

Повна прогнозована невизначеність методики буде складати:  $\Delta_{As,r} = \sqrt{\Delta_{SP,r}^2 + \Delta_{FAO,r}^2} = \sqrt{1.43^2 + 0.75^2} = 1.61 \%$ . Отримане значення вдвічі менше максимально допустимого значення ( $\max \Delta_{As} = 3.20 \%$ ), що свідчить про можливість використання методики для кількісного визначення ментолу в мазі.

В процесі аналізу були визначені параметри, які характеризують лінійну залежність (табл. 4.3). Отримані значення задовольняють вимоги: кутовий коефіцієнт лінійної залежності  $b$  майже рівний 1, вимоги до величини вільного



члену лінійної залежності виконуються за обома критеріями, відносно стандартне відхилення не перевищує допустиме значення, а коефіцієнт кореляції вище його.

Таблиця 4.3

**Метрологічні характеристики лінійної залежності методики кількісного визначення ментолу**

Величина	Значення	Допустимі критерії	Висновок про відповідність
$b$	1.002	-	-
$S_b$	0.0006	-	-
$(b-1)$	0.002	-	відповідає
$a$	0.0036	статистична незначущість $a \leq t(95\%, n-2) \times S_a$ ( $a \leq 1.16$ ) практична незначущість $a \leq 5.12$	виконується за обома критеріями
$S_a$	0.35	-	-
$S_0$	1.49	$\max S_0 = 1.87$	відповідає
$S_Y$	13.69	-	-
$r$	0.9999	$R_c \geq 0.9985$	відповідає

Вивчення лінійності методики проводили в концентраційному діапазоні від  $7.81 \times 10^{-7}$  до  $2 \times 10^{-4}$  г/мл ментолу з аналізом дев'яти рівновіддалених концентрацій з трьома повторними визначеннями кожної з них. За отриманими даними був побудований графік лінійної залежності площі піку ментолу від його концентрації у нормалізованих координатах (рис. 4.3).

Паралельно з вивченням лінійності проводились розрахунки параметрів правильності та прецизійності методики. Для вивчення правильності методики була розрахована систематична похибка ( $\delta$ ). Її значення ( $\delta = 0.87$  %) перевищує критерій статистичної незначущості ( $\delta > 0.073$  %), однак, в той же час, відповідає критерію практичної незначущості ( $\delta < 1.02$  %).

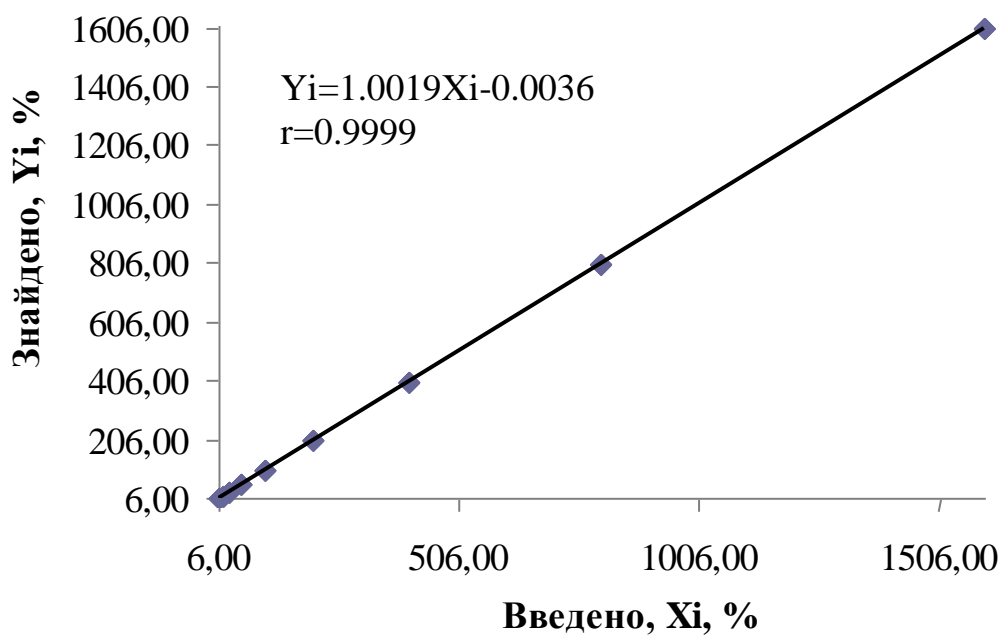


Рис. 4.3 Графік лінійної залежності площі піку ментолу від його концентрації у нормалізованих координатах

Для оцінки прецизійності методики був розрахований однобічний довірчий інтервал значень  $\Delta_Z$ . Отримане значення майже в десять разів менше максимально припустимої невизначеності аналізу ( $\Delta_Z=0.38 \leq 3.20$  %). Крім цього, була визначена збіжність результатів кількісного визначення ментолу в одному і тому ж зразку мазі шляхом проведення семи паралельних визначень (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

#### Оцінка збіжності методики кількісного визначення ментолу методом ГХ-ПД

№ зразка	Площа піку ментолу	Концентрація ментолу
1.	5972	0.0397
2.	6033	0.0401
3.	5896	0.0392
4.	5983	0.0397
5.	6099	0.0405
6.	5985	0.0397
7.	5944	0.0395

Середнє	5987.43	0.0398
RSD, %	1.08	1.08

Отримане значення відносного стандартного відхилення 1.08 % не перевищує допустимий критерій (за вимогами ДФУ для семи паралельних ін'єкцій не більше 3.08 %) [8].

В ході дослідження була визначена специфічність методики. Для цього був проведений аналіз мазі, виготовленої за тим самим прописом, але без додавання ментолу. Крім цього, для оцінки впливу розчинника (метанолу) був проведений і його аналіз розробленим методом. Отримані хроматограми (рис. 4.4) свідчать про специфічність методики, оскільки на місці виходу ментолу не спостерігається піків в обох випадках.

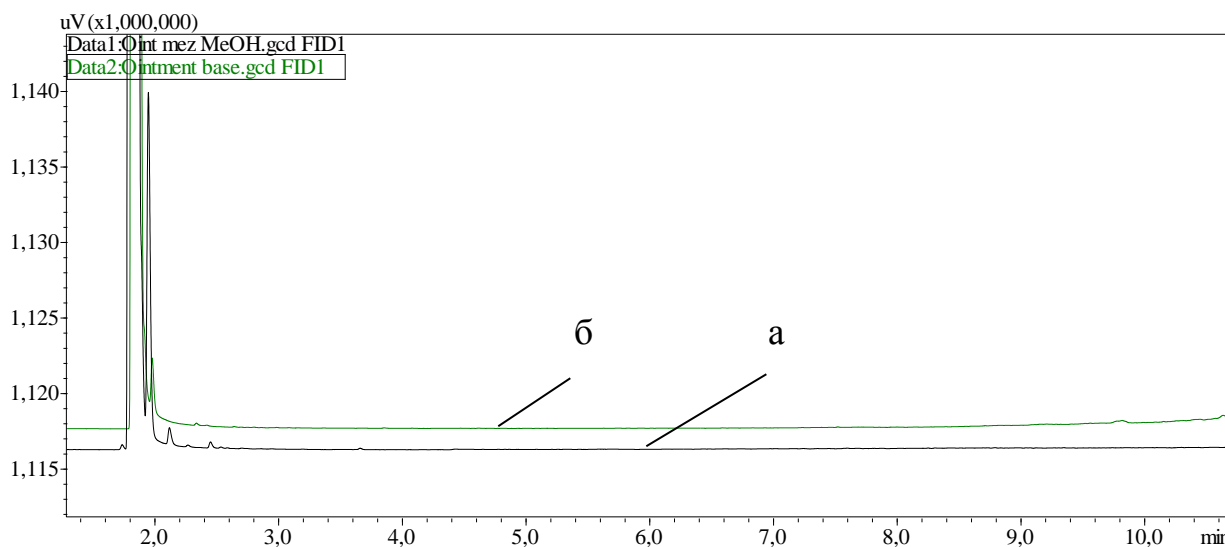


Рис. 4.4 Хроматограми, одержані при елююванні розчинника (бланку) (а) та метанольного екстракту з мазі без ментолу (б)

Отримані результати свідчать про можливість використання методу для кількісного визначення ментолу в досліджуваній мазі. Його перевагами є простота пробопідготовки з наступним прямим визначенням ментолу у випробовуваному розчині.

В процесі аналізу була проведена оцінка відповідності мазі вимогам ДФУ за допусками відхилення у кількісному вмісті ментолу в мазі ( $\pm 10\%$ ). Середнє значення кількісного вмісту ментолу в мазі склало 0.0398 г (за прописом 0.04 г), що складає 99.50% від прописаної кількості. Таким чином, мазь відповідає вимогам статті ДФУ “Мазі аптечного виготовлення” [9].

#### 4.3 Вибір та верифікація методики кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду

За рахунок наявності в молекулі фенілефрину гідрохлориду зв'язаної хлористоводневої кислоти, для його кількісного визначення можуть бути використані титрування методом аргентометрії (схема 4.5), алкаліметрії (схема 4.6) чи меркуриметрії (схема 4.7) [23, 42].

Схема 4.5

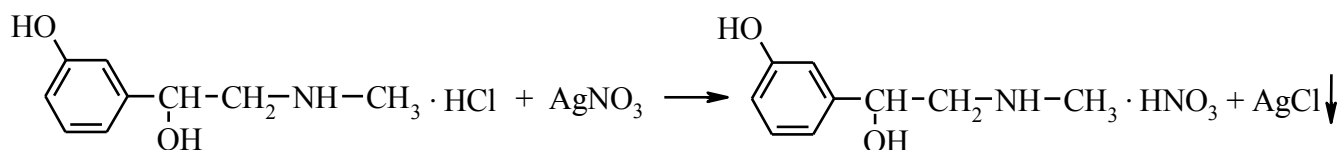


Схема 4.6

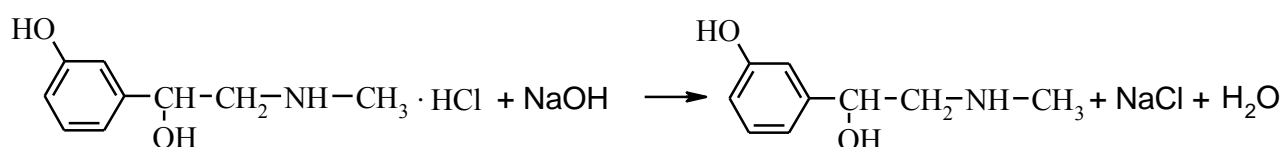
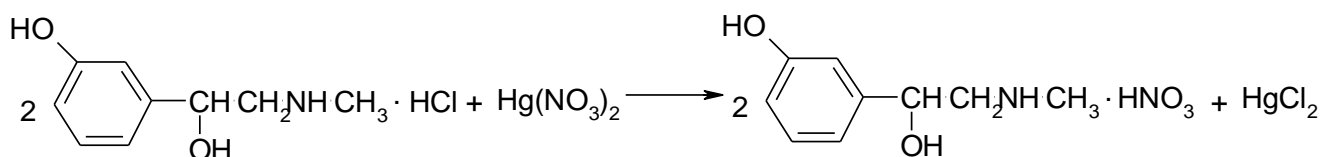


Схема 4.7



Фенілефрину гідрохлорид може бути визначений методом ацидиметрії в неводному середовищі в присутності ртуті (II) ацетату (схема 4.8) [42].

Крім цього, за рахунок наявності фенольного радикалу в молекулі фенілефрину гідрохлориду, він може бути визначений методом броматометрії – зворотного титрування з контрольним дослідом (схема 4.9) [21, 23, 42].

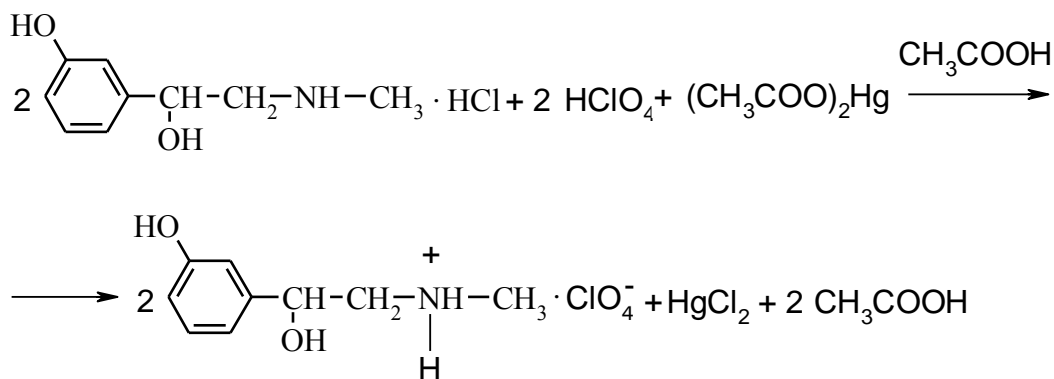
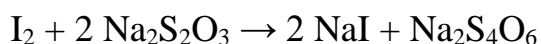
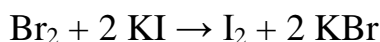
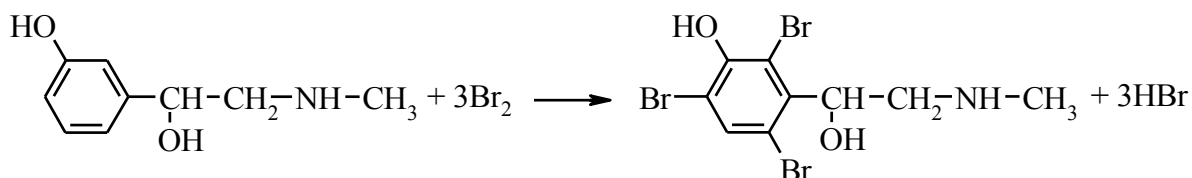
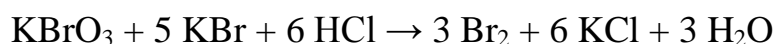


Схема 4.9



Однак, проведення аналізу методом неводного титрування потребує наявності спеціальної установки, для кількісного визначення методами аргентометрії та броматометрії необхідна наважка мазі 5.00 г, що складає половину від загальної маси мазі. Крім цього, всі титриметричні методи кількісного визначення мають більшу похибку, ніж інструментальні. Тому для кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду в мазі був обраний метод абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області [23].

Для проведення аналізу з відповідною точністю важливим є проведення повної екстракції досліджуваної речовини з мазі. За рахунок того, що сполука є сіллю слабкої основи та сильної кислоти, фенілефрину гідрохлорид може бути екстрагований з мазі 0.1 М розчином хлористоводневої кислоти. Прикладом використання даного розчинника є проведений аналіз розчину для ін'єкцій фенілефрину гідрохлориду методом спектрофотометрії [113], тому він був обраний для його екстракції з маzewої основи [139].

Для проведення аналізу були виготовлені випробовуваний розчин та розчин порівняння [31].

*Випробовуваний розчин.* 1.00 г мазі нагрівають на водяній бані з 10 мл 0.1 М розчину хлористоводневої кислоти, ретельно перемішують скляною паличкою, охолоджують і фільтрують у мірну колбу місткістю 25.0 мл. Операцію повторюють ще два рази, використовуючи по 5 мл 0.1 М розчину хлористоводневої кислоти. Об'єм розчину доводять 0.1 М розчином хлористоводневої кислоти до 25.0 мл і перемішують.

*Розчин порівняння.* 0.02 г СЗ фенілефрину гідрохлориду розчиняють у 0.1 М розчині хлористоводневої кислоти в мірній колбі на 25.0 мл, доводять об'єм розчину 0.1 М розчином хлористоводневої кислоти до мітки 25.0 мл. 1.0 мл одержаного розчину поміщають в мірну колбу на 10.0 мл, доводять 0.1 М розчином хлористоводневої кислоти до об'єму 10.0 мл.

*Компенсаційний розчин.* 0.1 М розчин хлористоводневої кислоти.

Дослідження проводили в спектральній області від 220 нм до 300 нм.

Оптичну густину випробовуваного розчину та розчину порівняння вимірювали за довжини хвилі 273 нм відносно компенсаційного розчину (рис. 4.5).

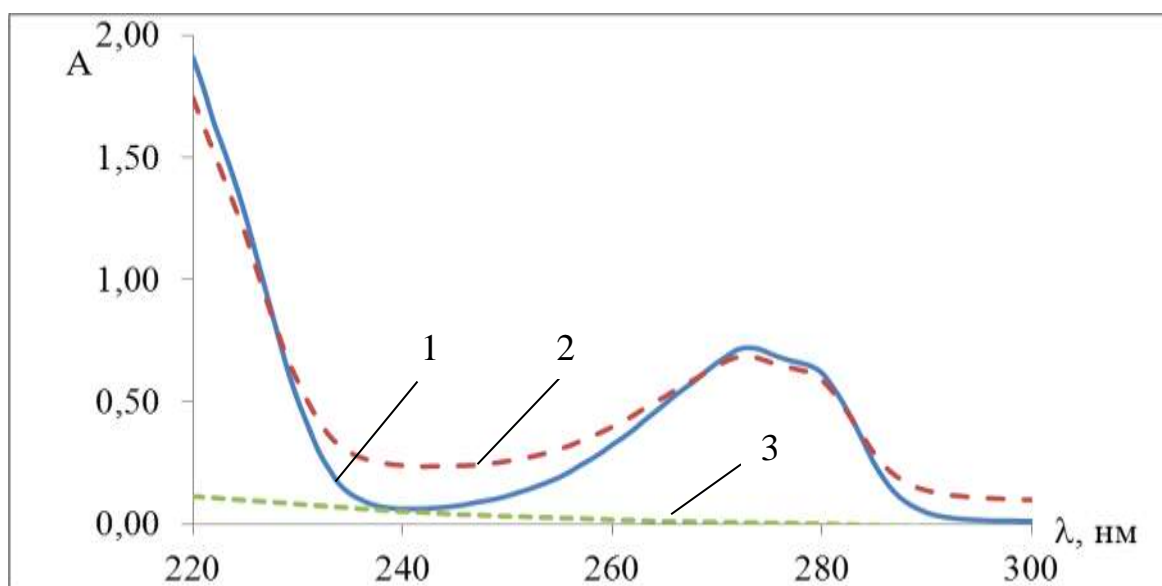


Рис. 4.5 Абсорбційні спектри поглинання розчинів: 1 – СЗ фенілефрину гідрохлориду, 2 – екстракту з мазі, 3 – плацебо у 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти

УФ-спектр поглинання випробовуваного розчину мазі майже співпадає зі спектром розчину стандартного зразка (СЗ) фенілефрину гідрохлориду.

Основною умовою використання фотометричних методів для кількісного визначення будь-якої сполуки є підпорядкування світлопоглинання її розчинів закону Бугера-Ламберта-Бера. Для перевірки підпорядкування даному закону були виготовлені розчини СЗ фенілефрину гідрохлориду з рівновіддаленою концентрацією та розраховані величини питомого показника поглинання.

*Приготування розчину СЗ фенілефрину гідрохлориду.* Близько 0.05 г фенілефрину гідрохлориду поміщають в мірну колбу місткістю 100.0 мл, розчиняють у 60 мл 0.1 М розчину хлористоводневої кислоти, доводять об'єм розчину тим же розчинником до мітки 100.0 мл і ретельно перемішують (розчин 1).

*Побудова градувального графіку.* 2.0 мл; 4.0 мл; 6.0 мл; 8.0 мл; 10.0 мл; 12.0 мл; 14.0 мл або 16.0 мл розчину 1 вміщують в мірну колбу місткістю 100.0 мл, доводять об'єм розчину 0.1 М розчином хлористоводневої кислоти до мітки і перемішують.

Оптичну густину отриманих розчинів вимірювали за довжини хвилі 273 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували 0.1 М розчин хлористоводневої кислоти. Отримані результати наведені в таблиці 4.5.

*Таблиця 4.5*

**Результати вивчення підпорядкування світлопоглинання розчинів СЗ фенілефрину гідрохлориду закону Бугера-Ламберта-Бера**

№ за/п	1	2	3	4	5	6	7	8
С, %	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008
А	0,118	0,185	0,282	0,375	0,458	0,542	0,628	0,718
$A_{1cm}^{1\%}$	118	93	92	94	92	90	90	90

За отриманими результатами був побудований графік залежності оптичної густини ( $A$ ) від концентрації розчину ( $C$ ) (рис. 4.6). Як видно з даних табл. 4.5 і рис. 4.6 світлопоглинання розчинів СЗ фенілефрину гідрохлориду в 0.1 М розчині хлористоводневої кислоти закону Бугера-Ламберта-Бера відбувається в межах концентрацій речовини від 0.002 % до 0.008 %. Питомий показник поглинання в умовах експерименту при відкиданні крайнього значення рівний  $92 \pm 1,73$ . Отримане значення співпадає з даними літератури [79].

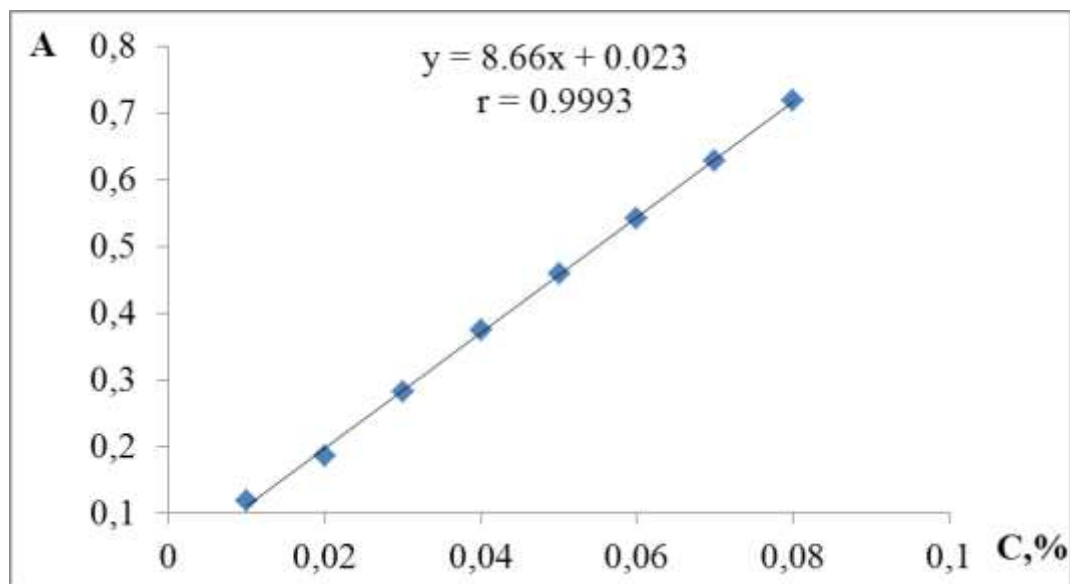


Рис. 4.6 Градувальний графік залежності оптичної густини від концентрації розчинів фенілефрину гідрохлориду

Величини питомого показника поглинання були піддані статистичній обробці за рекомендаціями статті 5.3.N.1. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту<sup>N</sup> ДФУ [8]. Отримані результати можуть бути визнані вірогідними лише тоді, якщо варіанти, які входять до вибірки не мають грубої похибки. Для виключення такої похибки вибірка (табл. 4.5) перевіряється на однорідність [8].

Якщо враховувати всі 8 значень питомих показників поглинання, значення  $A_{lin}^{1\%} = 118$  має бути виключене з сукупності результатів вимірювань як обтяжене грубою похибкою, оскільки значення  $Q_7 = 0,86$  перевищує контрольний критерій



$Q(8; 95\%)=0,48$ ;  $Q(8; 99\%)=0,58$ . Тому розрахунки проводились для інших семи значень питомого показника поглинання.

Величина розмаху варіювання  $R$ :

$$R = |90 - 94| = 4$$

Контрольні критерії для ідентифікації грубих похибок:

$$Q_1 = \frac{|90 - 90|}{4} = 0,00$$

$$Q_2 = \frac{|90 - 90|}{4} = 0,00$$

$$Q_3 = \frac{|90 - 92|}{4} = 0,50$$

$$Q_4 = \frac{|92 - 92|}{4} = 0,00$$

$$Q_5 = \frac{|92 - 93|}{4} = 0,25$$

$$Q_6 = \frac{|93 - 94|}{4} = 0,25$$

Для 7 отриманих результатів за табл. 11.1 додатка розділу 5.3.N.1 ДФУ [8] отримані контрольні критерії складають:

$$Q(7; 95\%)=0.51 \text{ та } Q(7; 99\%)=0.64.$$

Вибірку можна вважати однорідною з вірогідністю 95 % та 99 %, оскільки ні одне із значень не перевищує контрольні критерії [8].

Після цього були розраховані метрологічні характеристики середнього результату.

Середнє значення:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = \frac{90 + 90 + 90 + 92 + 92 + 93 + 94}{7} = 91,57$$

Дисперсія:

$$S^2 = \frac{(\sum_{i=1}^n x_i^2) - n\bar{x}^2}{\nu} = 2,9243 \quad (\nu=n-1)$$

Стандартне відхилення:

$$S = \sqrt{S^2} = 1,7101$$

Стандартне відхилення середнього результату:

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}} = 0,6464$$

Довірчий інтервал результату окремого визначення:

$$x \pm \Delta x = x \pm t(P_2, \nu) \cdot S = 91.57 \pm 4.18$$

Довірчий інтервал середнього результату:

$$\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = \bar{x} \pm \frac{t(P_2, \nu) \cdot S}{\sqrt{n}} = 91.57 \pm 1.58$$

Відносна невизначеність результату окремого визначення:

$$\varepsilon = \frac{\Delta x}{x} \cdot 100\% = 4.57\%$$

Відносна невизначеність середнього результату:

$$\bar{\varepsilon} = \frac{\Delta \bar{x}}{\bar{x}} \cdot 100\% = 1.73\%$$

Метрологічні характеристики середнього результату питомого показника поглинання фенілефрину гідрохлориду наведені в таблиці 4.6. Отримане значення відносної невизначеності середнього результату задовольняє вимоги ДФУ.

Таблиця 4.6

**Метрологічні характеристики середнього результату питомого показника поглинання**

$m$	$\nu$	$\bar{x}$	$S$	$S_x$	$P$	$t(P, \nu)$	$\Delta \bar{x}$	$\bar{\varepsilon}, \%$
7	6	91.57	1.7101	0.6464	95	2.4469	1.58	1.73

Обов'язковим етапом підтвердження можливості застосування методики в контролі якості ЛЗ у випадку вже розробленої методики є його верифікація. Вона проводиться з визначенням основних валідаційних характеристик у випадку застосування існуючої методики для кількісного визначення компонента в ЛЗ з іншим складом. Визначення всіх валідаційних характеристик проводили за вимогами статті 5.3.N.2. Валідація аналітичних методик і випробувань ДФУ [8] та іншими існуючими рекомендаціями [5, 12]. Валідаційні характеристики методики кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду методом спектрофотометрії вивчали на модельних сумішах розчинів його СЗ. Для аналізу випробовуваного розчину мазі була використана концентрація фенілефрину гідрохлориду  $8 \times 10^{-5}$  г/мл [139].

На початку аналізу був здійснений прогноз невизначеності результатів кількісного визначення. Враховуючи допуски відхилення в кількісному вмісті компонентів в мазах аптечного виготовлення ( $\pm 10\%$ ) максимально допустима невизначеність аналізу складає  $\max \Delta_{As} = 10 \times 0.32 = 3.2\%$ . Повна невизначеність методики аналізу складається з двох частин – невизначеності пробопідготовки ( $\Delta_{SP}$ ) та невизначеності кінцевої аналітичної операції ( $\Delta_{FAO}$ ).

При розрахунках невизначеності пробопідготовки (табл. 4.7) враховували невизначеність вагів, які використовувались для зважування та мірного посуду, який використовувався при приготуванні розчинів.

Таблиця 4.7

**Розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння та випробовуваного розчину фенілефрину гідрохлориду**

<i>Операція пробопідготовки</i>	<i>Параметр розрахункової формули</i>	<i>Невизначеність, %</i>
<b>Розчин порівняння</b>		
Зважування фенілефрину гідрохлориду на аналітичних вагах, г	$m_{st}$	$0.0002/0.02 \times 100 = 1.00$
Розведення в мірній колбі, мл	25	0.23
Взяття аліквоти, мл	1	0.74
Розведення в мірній колбі, мл	10	0.50
Повна невизначеність приготування	$\Delta_{SP} = \sqrt{1.00^2 + 0.23^2 + 0.74^2 + 0.50^2} = 1.36\%$	
<b>Випробовуваний розчин ЛФ</b>		
Зважування мазі на аналітичних вагах, г	$m_{st}$	$0.0002/1.00 \times 100 = 0.02$
Розведення в мірній колбі, мл	25	0.23
Повна невизначеність приготування	$\Delta_{SP} = \sqrt{0.02^2 + 0.23^2} = 0.23\%$	

Повна прогнозована невизначеність пробопідготовки склала 1.38 %. В даному випадку співвідношення:  $\Delta_{SP} \leq 0.32 \times \Delta_{As} = 1.024$  % не виконується, однак, зазвичай, основним джерелом невизначеності результатів у проведенні визначення методом прямої спектрофотометрії є, як правило, пробопідготовка. Водночас, отриманий результат підвищує вимоги до величини невизначеності кінцевої аналітичної операції.

Невизначеність кінцевої аналітичної операції для методу спектрофотометрії розраховували з використанням коефіцієнту Гауса 1,65 для однобічної імовірності 95% [8]. Розрахунки проводили з урахуванням наявності 2 розчинів – випробовуваного та розчину порівняння, а також не менше 3 паралельних вимірювань оптичної густини з вийманням кювети (4.1):

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \cdot \frac{RSD_A \cdot 1.65}{\sqrt{n}}, \quad (4.1)$$

де  $RSD_A$  – відносне стандартне відхилення оптичної густини для методу спектрофотометрії (0,52%);

1,65 – коефіцієнт Гауса для однобічної імовірності 95%;

n – кількість паралельних вимірювань (n=3) [4-6, 8].

Повна невизначеність даної методики аналізу складає:

$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{FAO}^2 + \Delta_{SP}^2} = \sqrt{0.70^2 + 1.38^2} = 1.55$  %. Її значення не перевищує max  $\Delta_{As}$ , що свідчить про те, що методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

Однією із основних валідаційних характеристик методики кількісного визначення є її специфічність, яка характеризує можливість точного визначення досліджуваного компоненту в присутності інших інгредієнтів ЛФ [8, 12]. Для вивчення специфічності методики ( $\delta_{noise}$ , %) був виготовлений розчин плацебо за методикою виготовлення випробуваного розчину, але з використанням мазі без додавання фенілефрину гідрохлориду. Оптичну густину розчину плацебо визначали три рази з вийманням кювети з паралельним вимірюванням оптичної густини розчину порівняння. На отриманому спектрі поглинання розчину плацебо (рис. 4.2) відсутні будь-які максимуми поглинання, що свідчить про незначний

вплив інших складових мазі на результати кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду в аналітичній довжині хвилі (273 нм) в середовищі 0.1 М розчину хлористоводневої кислоти.

Внесок плацебо розраховували за нижченаведеною формулою (4.2). Отриманий результат значно нижче встановленого критерію, що свідчить про його незначимий вплив на сумарне поглинання препарату.

$$\frac{A_{\text{blank}}}{A_{\text{st}}} \times 100 = \frac{0,002}{0,429} \times 100 = 0,47 \% \leq \max \delta \leq 1,02 \% \quad (4.2)$$

Подальшим етапом дослідження стала перевірка робастності методики. Для цього було вивчено стабільність розчинів у часі. Була виміряна оптична густина випробовуваного розчину фенілефрину гідрохлориду і розчину порівняння фенілефрину гідрохлориду в максимумі поглинання за довжини хвилі 273 нм. Вимірювання оптичної густини для обох розчинів проводили тричі з вийманням кювети одразу після приготування розчинів, а потім через 15, 30, 45 та 60 хвилин.

Отримані результати свідчать, що розчин стабільний протягом години (табл. 4.8).

Таблиця 4.8

#### Вивчення стабільності аналітичних розчинів

Розчин	Термін дослідження стабільності (t, хв.)					Серед- не	RSD <sub>t</sub> , %	Δt, %	max δ, %
	0	15	30	45	60				
Випробовуваний	0,435	0,435	0,435	0,436	0,435	0,435	0,103	0,219	1,024
Порівняння	0,428	0,429	0,429	0,428	0,428	0,428	0,128	0,273	

Величина  $\Delta_t$  для випробовуваного розчину і розчину порівняння є незначимою у порівнянні з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу. Отримані значення задовольняють наступну нерівність:  $\Delta_t \leq 0.32 \cdot \max \Delta_{A_s}$ .

Стабільність розчинів підтверджує незначний вплив реактивів, обладнання та суб'єктивного фактору при відтворенні методики в будь-якій лабораторії.

Після цього були вивчені лінійність, правильність та прецизійність методики в концентраційному діапазоні 80-120 % від номінальної концентрації досліджуваної речовини в мазі. В обраному діапазоні були досліджені дев'ять концентрацій з кроком 5 %. За результатами досліджень розраховані параметри, які характеризують лінійну залежність (табл. 4.9). Критерії параметрів лінійної залежності розраховані відповідно до допусків відхилення у вмісті компонентів екстемпоральних мазей ( $\pm 10\%$ ).

Таблиця 4.9

**Результати дослідження параметрів лінійної залежності методики кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області**

Величина	Значення	Допустимі критерії	Висновок про відповідність
$b$	0.98	-	-
$S_b$	0.012	-	-
$(b-1)$	0.020	-	відповідає
$a$	2.31	статистична незначущість $a \leq t(95\%, n-2) \times S_a$ ( $a \leq 2,32$ ) практична незначущість $a \leq 5,12$	виконується за обома критеріями
$S_a$	1.22	-	-
$S_0$	0.47	$\max S_0 = 1.69$	відповідає
$S_Y$	13.69	-	-
$r$	0.9994	$\min r = 0.9924$	відповідає

Отримані значення свідчать, що виконуються вимоги до всіх параметрів лінійної залежності: кутовий коефіцієнт лінійної залежності  $b$  незначно

відрізняється від одиниці, виконуються вимоги до статистичної та практичної незначущості вільного члена лінійної залежності  $a$ , значення залишкового стандартного відхилення  $S_0$  не перевищує критерій, а значення лінійного коефіцієнту кореляції  $r$  є значно вищим за нього. За результатами вивчення лінійності був побудований калібрувальний графік у нормалізованих координатах (рис. 4.7).

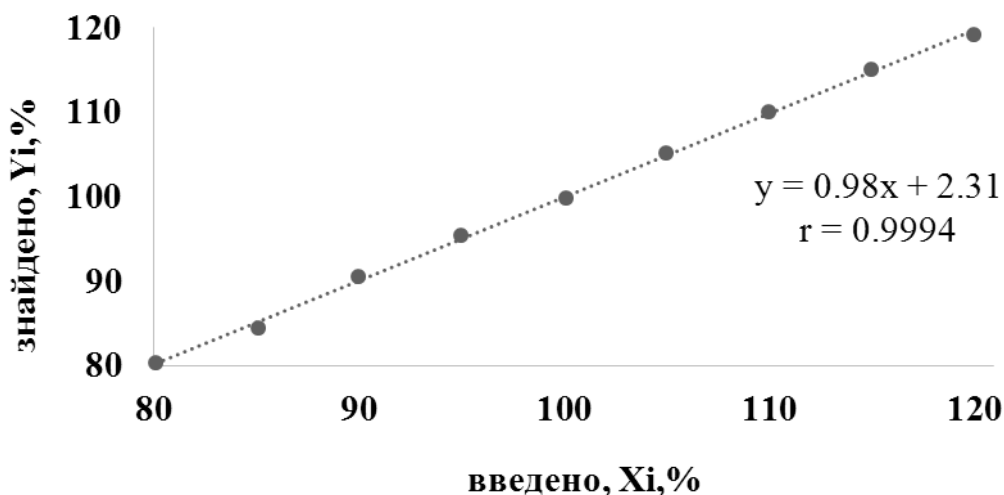


Рис. 4.7 Графік лінійної залежності оптичної густини від концентрації фенілефрину гідрохлориду в нормалізованих координатах

Одночасно з вивченням лінійності проводилось вивчення параметрів правильності та прецизійності з використанням даних, отриманих при вивченні лінійності досліджуваної методики за стандартизованою процедурою (табл. 4.10) [4-6, 12].

Таблиця 4.10

**Результати дослідження прецизійності та правильності методики кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області**

Валідаційна характеристика	Отримане значення
$\bar{z}$	100.20
$S_z$	0.21

$\Delta_Z$	0.39
Критерій для однобічного довірчого інтервалу $\Delta_Z \leq \Delta_{As}$ ( $0.39 \leq 3.20$ )	
$\delta$	0.20
Критерій статистичної незначущості $\delta$ , $\% \leq 0.13$	
Критерій практичної незначущості $\delta$ , $\% \leq 0.32 \times \Delta_{As} = 1.02$	

Отримані результати свідчать про відповідність валідаційних параметрів вимогам ДФУ. Таким чином, методика може бути використана для кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду в досліджуваній мазі та вивчення її хімічної стабільності.

Після аналізу досліджуваної мазі з використанням верифікованої методики вміст фенілефрину гідрохлориду в мг визначали двома способами: методом стандарту (4.3) та методом питомого показника поглинання (4.4) з метою визначення оптимального способу розрахунку.

$$X, \text{мг} = \frac{A \cdot m_{C3} \cdot V_{\text{м.к.}} \cdot V_{nC3} \cdot m_{\text{мазі}} \times 1000}{A_{C3} \cdot m_n \cdot V_{\text{м.к.}C3}}, \quad (4.3)$$

$$X, \text{мг} = \frac{A \cdot V_{\text{м.к.}} \cdot m_{\text{мазі}} \times 1000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot m_n \cdot 100}, \quad (4.4)$$

де:  $A$  – оптична густина випробовуваного розчину;

$A_{C3}$  – оптична густина розчину порівняння;

$m_{C3}$  – маса наважки СЗ фенілефрину гідрохлориду, г;

$m_n$  – маса наважки мазі, г;

$m_{\text{мазі}}$  – маса мазі за прописом, г;

$V_{\text{м.к.}}$  – об'єм мірної колби, мл;

$V_{\text{м.к.}C3}$  – об'єм мірної колби для розведення стандартного зразку, мл;

$V_{nC3}$  – об'єм піпетки, мл;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$  – питомий показник поглинання, що дорівнює 92.



Результати визначення кількісного вмісту фенілефрину гідрохлориду в мазі методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області при розрахунку методом стандарту (табл. 4.11) та методом питомого показника поглинання (табл. 4.12) свідчать, що обидва способи розрахунку дають практично однакові результати.

Таблиця 4.11

**Результати визначення кількісного вмісту фенілефрину гідрохлориду в мазі  
(розрахунок методом стандарту (P=95 %; t(P, v)=2,0150))**

№ п/п	A <sub>сз</sub>	A	m <sub>нав</sub> мазі, Г	Знайдено, МГ	Метрологічні характеристики
1.	0.722	0.676	1.0018	20.02	$\bar{X}=19.73; S^2=0.1175$ $S=0.3428; s_x=0.1399$ $\Delta x=0.69$ $\Delta \bar{x}=0.28$ $\bar{\epsilon}, \% =1.42$
2.		0.682	1.0032	20.17	
3.		0.678	1.0102	19.92	
4.		0.663	1.0097	19.48	
5.		0.659	1.0073	19.41	
6.		0.657	1.0048	19.40	

Таблиця 4.12

**Результати визначення кількісного вмісту фенілефрину гідрохлориду в мазі  
(розрахунок методом питомого показника поглинання  
(P=95 %; t(P, v)=2,0150))**

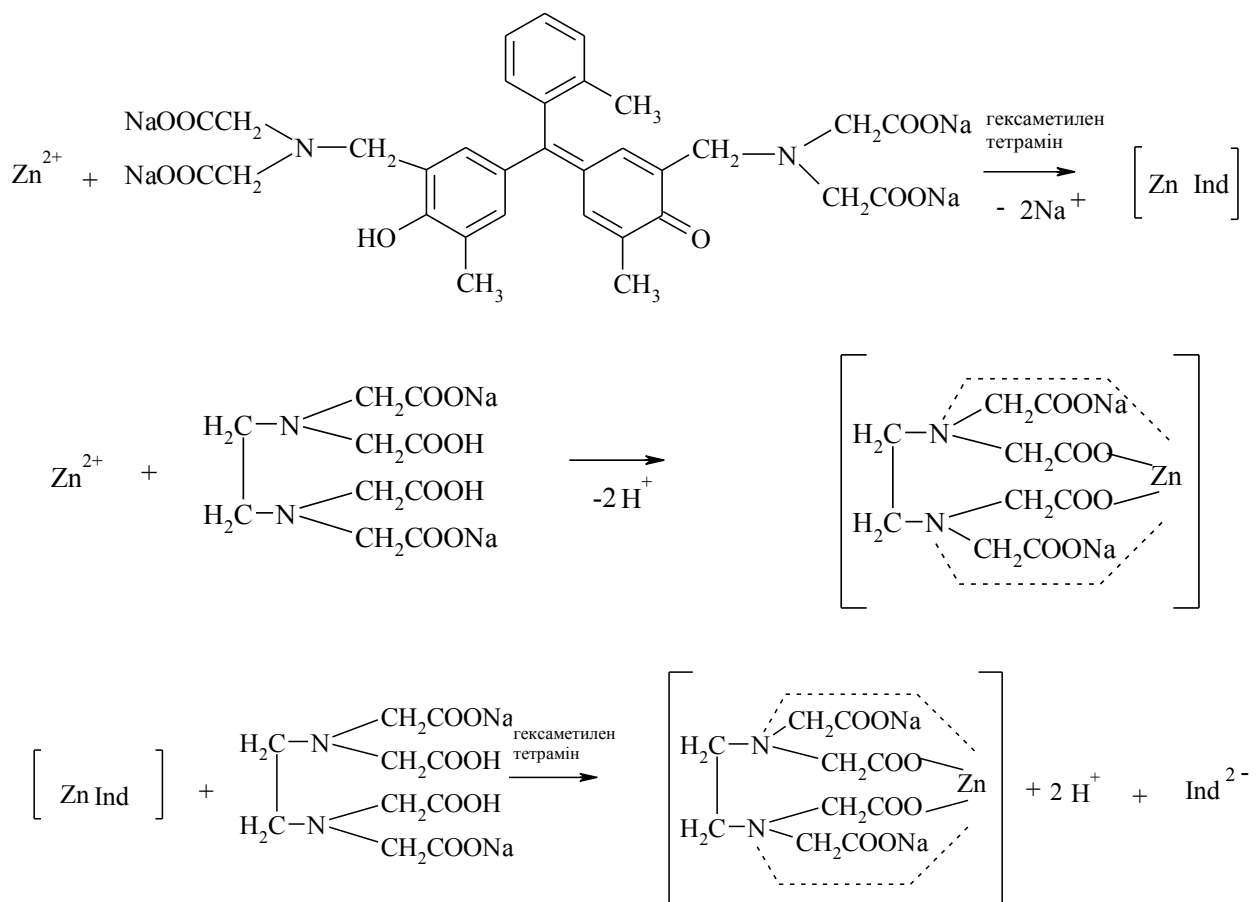
№ п/п	A <sub>1%<sup>1</sup> 1см</sub>	A	m <sub>нав</sub> мазі, Г	Знайдено, МГ	Метрологічні характеристики
1.	92	0.676	1.0018	18.89	$\bar{X}=18.62; S^2=0.1052$ $S=0.3243; s_x=0.1324$ $\Delta x=0.65$ $\Delta \bar{x}=0.27$ $\bar{\epsilon}, \% =1.45$
2.		0.682	1.0032	19.03	
3.		0.678	1.0102	18.79	
4.		0.663	1.0097	18.38	
5.		0.659	1.0073	18.31	
6.		0.657	1.0048	18.30	

Таким чином, для скорочення часу аналізу та зменшення витрат на кількісне визначення фенілефрину гідрохлориду методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області розрахунок його кількісного вмісту можна проводити методом питомого показника поглинання.

#### 4.4. Верифікація методики кількісного визначення цинку оксиду

Для кількісного визначення цинку оксиду ДФУ [7], як і Європейська Фармакопея [89] рекомендують проводити кількісне визначення методом комплексометрії (схема 4.10).

Схема 4.10



Однак, в літературних джерелах не зустрічається опису використання даного методу для кількісного визначення цинку оксиду в складі досліджуваної мазі. Тому, з огляду на сучасні вимоги, перед використанням методики в аналізі вона була верифікована [8, 17]. Крім цього, в монографії “Цинку оксид”

рекомендована наважка субстанції для проведення кількісного визначення 0.150 г що відповідає наважці мазі майже 6.5 г. Оскільки це складає більше половини загальної маси мазі, було вирішено спробувати зменшити наважку до 2.0 г [137].

*Випробовуваний розчин.* До 2.00 г мазі додають 10 мл оцтової кислоти розведеної Р. Суміш кип'ятять 5 хв на водяній бані. Після охолодження суміш фільтрують крізь паперовий фільтр у конічну колбу 500.0 мл, попереджуючи попадання жиру на фільтр. Вилучення оцтовою кислотою розведеною Р повторюють ще 2 рази по 5 мл, фільтруючи крізь той же фільтр в ту саму конічну колбу. Об'єм розчину доводять водою Р до 200 мл, додають близько 50 мг ксиленолового оранжевого індикаторної суміші Р, а потім гексаметилентетрамін Р до появи фіолетово-рожевого забарвлення розчину. Після цього додають додатково 2 г гексаметилентетраміну Р і титрують 0.1 М розчином натрію едетату до переходу фіолетово-рожевого забарвлення у жовте [31].

1 мл 0.1 М розчину натрію едетату відповідає 0.00814 г цинку оксиду.

Перед проведенням верифікації методики був здійснений прогноз невизначеності результатів аналізу, який у випадку титриметричних методів складається з невизначеності стандартизації титрованого розчину та проведення кількісного визначення досліджуваної речовини (табл. 4.13).

Таблиця 4.13

**Прогноз невизначеності методики кількісного визначення цинку оксиду в складі мазі**

<i>Назва операції</i>	<i>Параметр розрахункової формули</i>	<i>Невизначеність, %</i>
Стандартизація 0.1 М розчину натрію едетату		
Зважування цинку на аналітичних вагах, г	$m_c$	$0.0002/0.120 \times 100 = 0.17$
Титрування 0.1 М розчином натрію едетату	$V_T$ (бюретка на 25 мл)	$0.05/18.35 \times 100 = 0.27$

Невизначеність процесу стандартизації	$\Delta_{\text{std.}} = \sqrt{0.17^2 + 0.27^2} = 0.32$	
Кількісне визначення цинку оксиду		
Зважування мазі на аналітичних вагах, г	$m_{\text{st}}$	$0.0002/2.00 \times 100 = 0.01$
Титрування 0.1 М розчином натрію едетату	$V_{\text{T}}$ (бюретка на 10 мл)	$(0.02/5.90) \times 100 = 0.34$
Невизначеність процесу кількісного визначення	$\Delta_m = \sqrt{0.01^2 + 0.34^2} = 0.34$	
Повна невизначеність аналізу	$\Delta_{\text{tot}} = \sqrt{0.32^2 + 0.34^2} = 0.47$	

Оскільки верифікація методики здійснювалась на модельних сумішах, була розрахована повна невизначеність аналізу при використанні субстанції цинку оксиду ( $m_{\text{н}}=0.048$  г). В цьому випадку повна невизначеність аналізу буде складати 0.63 %.

Отримані значення прогнозованої невизначеності аналізу не перевищують максимально допустиму невизначеність аналізу (0.47 % та 0.63 % < 3.20 %).

В процесі верифікації методики були визначені наступні валідаційні характеристики [8]: лінійність, правильність, прецизійність та відтворюваність. Вивчення лінійності проводилось у діапазоні 80-120 % від номінального вмісту цинку оксиду в мазі. Аналіз проводився на п'яти рівновіддалених концентраціях цинку оксиду з кроком 10 % з трьома повторними визначеннями у кожній точці (табл. 4.14) [137].

Отримані результати свідчать про відповідність всіх параметрів лінійної залежності встановленим критеріям. За отриманими даними був побудований графік лінійної залежності об'єму титрованого розчину від концентрації досліджуваної речовини (рис 4.8), який підтверджує лінійність методики на всьому діапазоні концентрацій.

## Результати дослідження лінійності

Величина	Значення	Допустимі критерії	Висновок про відповідність
$b$	0.98	-	-
$S_b$	0.094	-	-
$(b-1)$	0.050	-	відповідає
$a$	2.20	статистична незначущість $a \leq t(95\%, n-2) \times S_a$ ( $a \leq 1.68$ ) практична незначущість $a \leq 5, 12$	виконується за другим критерієм
$S_a$	0.95	-	-
$S_0$	0.52	$\max S_0 = 1.81$	відповідає
$S_Y$	14.75	-	-
$r$	0.9994	$\min r = 0.9925$	відповідає

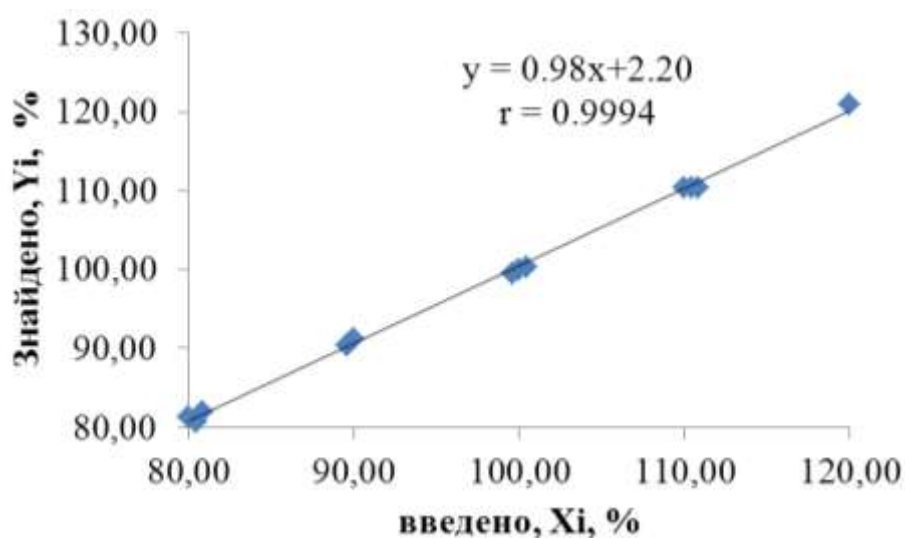


Рис. 4.8 Графік лінійної залежності об'єму 0.1 М розчину натрію едетату від концентрації цинку оксиду в нормалізованих координатах

Вивчення правильності та прецизійності проводили з використанням результатів, отриманих при дослідженні лінійності (табл. 4.15) [8, 13, 137].

Виконуються вимоги до параметрів правильності (за критерієм практичної незначущості систематичної похибки) та прецизійності ( $\Delta_Z \leq \Delta_{As}$ ). Отримані результати верифікації методики свідчать про можливість її використання для кількісного визначення цинку оксиду в мазі при вивченні її стабільності в процесі зберігання.

Таблиця 4.15

**Результати вивчення правильності та прецизійності методики кількісного визначення цинку оксиду**

<i>Величина</i>	<i>Значення</i>
$\bar{z}$	100.51
$S_z$	0.64
$\Delta_z$	1.13
Критерій для одnobічного довірчого інтервалу $\Delta_z \leq \Delta_{As}$ ( $1.13 \leq 3.20$ )	
$\delta$	0.51
Критерій статистичної незначущості $\delta, \% \leq 0.29$	
Критерій практичної незначущості $\delta, \% \leq 0.32 \times \Delta_{As} = 1.02$	

З використанням даної методики було проведено кількісне визначення цинку оксиду в мазі та визначені параметри відтворюваності методики (табл. 4.16) з проведенням шести паралельних визначень. Вміст цинку оксиду в мазі в грамах обчислювали за формулою (4.5):

$$X, z = \frac{V \cdot K \cdot T \cdot m_{\text{за прописом}}}{m_{\text{нав}}}, \quad (4.5)$$

де:  $V$  – кількість 0.1 М розчину натрію едетату, мл;

$T$  – титр цинку оксиду за 0.1 М розчином натрію едетату, г/мл;

$m_{\text{за прописом}}$  – маса мазі за прописом, г;

$m_{\text{нав}}$  – маса наважки ЛФ для кількісного визначення, г.

Низьке значення відносного стандартного відхилення, розраховане для отриманих результатів ( $RSD=0.65\%$ ) свідчить про можливість коректного відтворення методики.

Таблиця 4.16

**Результати вивчення відтворюваності методики кількісного визначення цинку оксиду в мазі**

№ зразку	$m_{\text{нав. мазі}}, \text{г}$	Знайдено $ZnO, \text{г}$	Вміст $ZnO, \%$
1.	1.9976	0.2374	98.92
2.	2.0634	0.2351	97.96
3.	2.1140	0.2380	99.17
4.	1.9930	0.2390	99.58
5.	2.0618	0.2395	99.79
6.	2.0714	0.2384	99.33
Середнє		0.2379	99.13
RSD, %		0.65	0.65

Середнє значення вмісту цинку оксиду в мазі склало 0.238 г (99.17 % від прописаної кількості), що свідчить про відповідність мазі вимогам ДФУ.

Отримані результати були піддані статистичній обробці та визначені метрологічні характеристики методики (таблиця 4.17).

Таблиця 4.17

**Метрологічні характеристики методики аналізу**

$m$	$\nu$	$\bar{x}$	$S$	$S_{\bar{x}}$	$P$	$t(P_2; \nu)$	$\Delta_x$	$\Delta_{\bar{x}}$	$\bar{\varepsilon}$
6	5	0.2379	0.001557	0.0006356	95	2.5706	0.0031	0.0013	0.55

Отримане значення відносної похибки методики кількісного визначення цинку оксиду в мазі складає 0.55 %, що відповідає вимогам ДФУ [8] та свідчить про можливість використання методики в аналізі.

#### 4.5 Оцінка мікробіологічної стабільності мазі

Вивчення мікробіологічної чистоти мазі проводили методом двочарового висівання (5-2-2-3, національна частина статті 2.6.12.) (методики наведені в розділі 2) [26, 37]. За вимогами статті 2.6.12. ДФУ була визначена придатність методики для аналізу. Отримані результати свідчать про можливість її використання для визначення загального числа бактерій (табл. 4.18) та грибів (табл. 4.19), оскільки в обох випадках не спостерігається значного пригнічення зростання мікроорганізмів.

Таблиця 4.18

#### Результати перевірки придатності методики визначення загального числа аеробних мікроорганізмів

Середнє число КУО в 1 г зразка					
<i>S. aureus</i> ATCC 6538		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	
дослід	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль
Соево-казеїновий агар					
95	97	94	109	97	94

Шляхом проведення негативного контрольного дослідження доведено відсутність впливу розчинників на результати аналізу (не спостерігалось зростання мікроорганізмів).

Після цього було проведено дослідження мікробіологічної чистоти мазі (табл. 4.20). Результати її оцінки свідчать про відсутність бактерій *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*.



**Результати перевірки придатності методики визначення загального числа дріжджових та плісневих грибів**

Середнє число КУО в 1 г зразка			
<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	
дослід	контроль	дослід	контроль
Сабуро-декстрозний агар			
94	98	94	104

Таблиця 4.20

**Результати дослідження зразків мазей за показником «мікробіологічна чистота»**

ТАМС, КУО/г	ТУМС, КУО/г	Мікроорганізми		
		<i>St. aureus</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
свіжовиготовлена мазь				
до 10	до 10	-	-	-
через 10 днів зберігання				
до 10	до 10	-	-	-
через 20 днів зберігання				
до 10	до 10	-	-	-
через 30 днів зберігання				
10	до 10	-	-	-

У свіжовиготовленому зразку мазі загальна кількість бактерій і грибів менше 10 КУО/г. У зразках при зберіганні 30 діб за температури  $5 \pm 3$  °С кількість

бактерій максимально не перевищує 10 КУО/г, а кількість грибів менше 10 КУО/г. Таким чином, зразки мазі для назального застосування відповідають вимогам статті 5.1.4. “Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів та субстанцій для фармацевтичного застосування” ДФУ [26, 37].

#### 4.6 Визначення реологічних параметрів мазі та їх оцінка в процесі зберігання

Вивчення реологічних параметрів мазі було розпочато з дослідження свіжовиготовленого препарату. Після проведення досліджень були побудовані криві залежності напруги зсуву та в'язкості від градієнту швидкості зсуву (рис. 4.9).

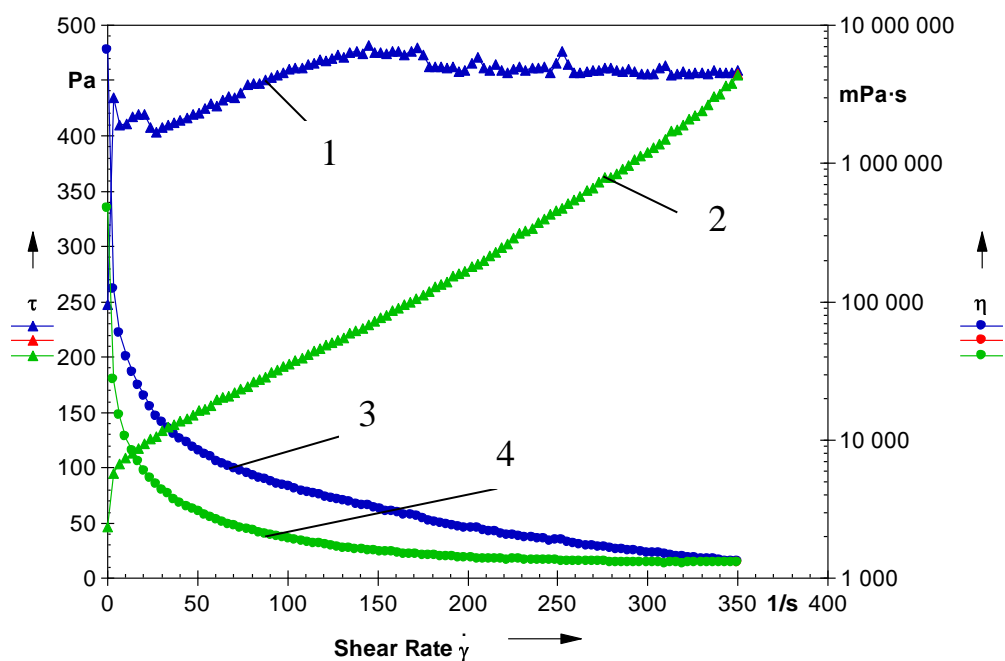


Рис. 4.9 Реограма плинину мазі Симановського

В період руйнування системи за рахунок обертання внутрішнього циліндру приладу, яке описує висхідна крива реограми (рис. 4.9, крива 1) система втрачає свою в'язкість (рис. 4.9, крива 3). Однак, даний процес ніколи не проходить повністю, оскільки частина зв'язків системи постійно відновлюється, навіть на великих швидкостях обертання [99]. Низхідна крива реограми (рис. 4.9, крива 2)

характеризує здатність системи до відновлення при зниженні швидкості зсуву. Її наявність дозволяє зробити висновок про стабільність системи при всіх її значеннях. Обидві криві утворюють петлю гістерезису, площа якої дозволяє оцінити механічну стійкість структурованих систем: чим вона менше, тим більше система механічно стійка. Площа гістерезису (66002,46 Па/с) (табл. 4.21) мазі Симановського свідчить про пластично-в'язкі та тиксотропні властивості мазі. Особливістю неньютонівських рідин є залежність їх в'язкості від величини напруги зсуву. При визначеному значенні граничної напруги зсуву (для досліджуваної мазі вона складає 99,27 Па, табл. 4.21) система виявляє пластичні властивості (пряма ділянка кривої 1 на реограмі, рис. 4.9). Досить високе значення граничної напруги зсуву мазі обумовлює її вазеліново-ланолінова основа, однак, така консистенція мазі є більш прийнятна, оскільки вона наноситься на слизову оболонку де надмірна плинність небажана.

Таблиця 4.21

#### Реологічні параметри свіжовиготовленої мазі

№	Показник	Значення
1.	Площа гістерезису, $A$ , Па/с	66002,46
2.	Гранична напруга зсуву $\tau_0$ , Па	99,27
3.	Структурна в'язкість при $\tau_0$ , $\eta_\infty$ , Па×с	0,37
4.	Коефіцієнт динамічного розрідження, $K_{d1}$ , % (висхідна крива)	67,40
5.	Коефіцієнт динамічного розрідження, $K_{d2}$ , % (висхідна крива)	78,46
6.	Коефіцієнт динамічного розрідження, $K_{d1}$ , % (низхідна крива)	61,45
7.	Коефіцієнт динамічного розрідження, $K_{d2}$ , % (низхідна крива)	66,95
8.	Механічна стабільність, MS	1,65

Інші реологічні параметри мазі (табл. 4.21) свідчать про оборотність деформацій при механічному впливі, забезпечують рівномірний розподіл на поверхні слизової оболонки та належний розподіл діючих речовин в основі при виготовленні. За літературними даними оптимальним значенням механічної стабільності є 1. Отримані значення свідчать про належну МС мазі та свідчать про її можливість витримувати певні механічні впливи (наприклад, процес гомогенізації при приготуванні) та дозволяє прогнозувати стабільність мазі в процесі зберігання.

Для оцінки ступеня збереження реологічних параметрів мазі при зберіганні були проведені дослідження протягом місяця (рис. 4.10). Отримані реограми незначно відрізняються одна від одної, а криві залежності в'язкості від швидкості зсуву майже накладаються одна на одну.

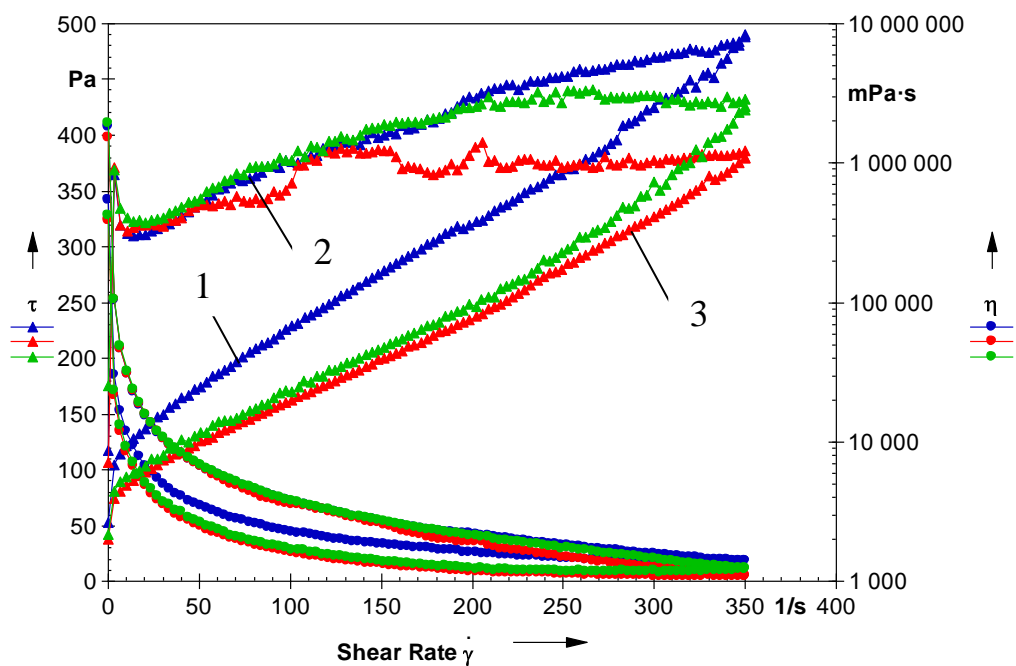


Рис. 4.10 Реограми плинину мазі Симановського протягом місяця: 1 – через 10 днів після приготування; 2 – через 20 днів після приготування; 3 – через 30 днів після приготування

Про схожість показників структурної в'язкості можна судити з отриманих значень при різних швидкостях зсуву (табл. 4.22). Вони незначно відхиляються від значень в'язкості свіжовиготовленого зразка мазі. Числові значення

структурної в'язкості зразків мазі на 10, 20 та 30 день зберігання свідчать про те, що вона знижується зі зростанням градієнту швидкості зсуву. Найбільшими значеннями структурної в'язкості характеризується свіжовиготовлена мазь, однак її величина для інших трьох зразків значно не відрізняється.

Таблиця 4.22

**Значення структурної в'язкості досліджуваних зразків мазі Симановського протягом місяця**

№ зразка	Структурна в'язкість (Па·с) досліджуваних зразків мазі в залежності від швидкості зсуву, $D_r$ $s^{-1}$							
	0,10	50,6	101,0	151,0	202,0	252,0	303,0	350,0
1	1730	8,32	4,56	3,14	2,30	1,89	1,51	1,31
2	1820 (+5,20)	6,69 (-19,59)	3,73 (-18,20)	2,64 (-15,92)	2,15 (-6,52)	1,79 (-5,29)	1,55 (+2,65)	1,40 (+6,87)
3	1930 (+11,56 )	6,79 (-18,39)	3,74 (-17,98)	2,70 (+14,01)	2,11 (+8,26)	1,74 (+7,94)	1,43 (+8,00)	1,24 (+5,34)
4	1530 (-11,56)	6,67 (-19,83)	3,53 (-22,59)	2,55 (+18,79)	1,93 (+16,09)	1,47 (-22,22)	1,24 (-17,88)	1,10 (+16,03)

Примітка.  $n = 5$ ,  $p \leq 0,05$  – відхилення показника достовірне в порівнянні з контролем (№ 1 – свіжовиготовлена мазь; № 2 – мазь через 10 днів після приготування; № 3 – мазь через 20 днів після приготування; № 4 – мазь через 30 днів після приготування)

Про близькість показників можна робити висновок і за іншими реологічними параметрами (табл. 4.23). Їх значення досить близькі, що свідчить про стабільність реологічних властивостей мазі та відповідність вимогам ДФУ за даним параметром.

Таким чином, протягом місяця не спостерігається негативних змін реологічних параметрів мазі, що гарантує збереження її споживчих властивостей.

## Показники реологічних параметрів мазі протягом 30 днів

№	Показник	Значення		
		10 днів	20 днів	30 днів
1.	Площа гістерезису, $A$ , Па/с	58780,50	57088,85	49521,13
2.	Гранична напруга зсуву $\tau_0$ , Па	105,78	80,78	77,21
3.	Структурна в'язкість при $\tau_0$ , $\eta_\infty$ , Па×с	0,39	0,38	0,34
4.	Коефіцієнт динамічного розрідження, $K_{d1}$ , % (висхідна крива)	70,39	69,52	70,76
5.	Коефіцієнт динамічного розрідження, $K_{d2}$ , % (висхідна крива)	77,09	77,17	77,80
6.	Коефіцієнт динамічного розрідження, $K_{d1}$ , % (низхідна крива)	60,47	60,81	60,56
7.	Коефіцієнт динамічного розрідження, $K_{d2}$ , % (низхідна крива)	65,87	65,60	65,28
8.	Механічна стабільність, MS	1,74	1,72	1,64

## 4.7 Вивчення фізико-хімічної стабільності мазі

З використанням обраних методик ідентифікації та розроблених методик кількісного визначення був проведений аналіз фізико-хімічної стабільності мазі протягом місяця. Отримані результати (табл. 4.24) [39] свідчать про відповідність якості мазі встановленим критеріям за параметрами опис, ідентифікація та кількісний вміст протягом 30 днів при її зберіганні за температури  $5 \pm 3$  °С.

Таблиця 4.24

## Результати дослідження фізико-хімічної стабільності мазі

Показник якості	Умови дослідження	Період зберігання				Висновок про відповідність
		Свіжовиготовлена	10 днів	20 днів	30 днів	
Опис	Мазь жовтуватого кольору, однорідна, без механічних включень, з характерним запахом ментолу	+	+	+	+	Відповідає
Ідентифікація	абсорбційна спектрофотометрія в УФ-області (max в 0.1 М HCl при $\lambda=273$ нм)	+	+	+	+	Відповідає
	з розчином срібла нітрату (утворення білого сирнистого осаду)	+	+	+	+	Відповідає
	з розчином калію фероціаніду (утворення білого драглистого осаду)	+	+	+	+	Відповідає

Продовж. табл. 4.24

	з розчином ваніліну в конц. сульфатній кислоті (утворення червоного забарвлення)	+	+	+	+	Відповідає
Кількісне визначення	фенілефрину гідрохлорид	20.21 мг	20.09 мг	19.96 мг	19.91 мг	Відповідає
	цинку оксид	0.2401 г	0.2395 г	0.2385 г	0.2345 г	Відповідає
	ментол	40.70 мг	39.95 мг	38.32 мг	38.30 мг	Відповідає



## Висновки до розділу 4

1. Вперше проведено вибір, розробку, валідацію та верифікацію методик кількісного визначення АФІ мазі Симановського аптечного виготовлення для подальшого дослідження її стабільності. Перед проведенням досліджень для всіх компонентів обрано оптимальний хід екстракції з маzewої основи.

2. Розроблена методика кількісного визначення ментолу в мазі методом ГХ-ПД. Визначені параметри придатності системи свідчать про можливість її використання для визначення кількісного вмісту ментолу в мазі. Валідаційні параметри методики відповідають встановленим вимогам:  $a=0.0036 \leq 1.16$ ,  $S_0=1.49 \leq 1.87$ ,  $r=0.9999 \geq 0.9985$ . Величини МВ ментолу ( $2.51 \times 10^{-7}$  г/мл) та МКВ ( $7.58 \times 10^{-7}$  г/мл) ментолу свідчать про достатню чутливість методики. Збіжність методики відповідає вимогам ( $RSD=1.08 \% < 3.08 \%$ ).

3. Проведена верифікація методики кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області. Встановлено, що внесок плацебо є незначущим в порівнянні з допустимим критерієм ( $0.47 \% \leq \max \delta \leq 1.02 \%$ ), аналітичні розчини залишаються стабільними протягом години, виконуються вимоги до параметрів лінійної залежності ( $a=2.31 \leq 2.32$  та  $5.12$ ,  $S_0=0.47 \leq 1.69$ ,  $r=0.9994 \geq 0.9924$ ), правильності ( $\delta=0.20 \% \leq 1.02 \%$ ) та прецизійності ( $\Delta_Z=0.39 \leq \Delta_{As}=3.20$ ).

4. Метрологічні характеристики результатів розрахунку кількісного вмісту фенілефрину гідрохлориду в мазі (методом стандарту та питомого показника поглинання) свідчать, що обидва способи дають практично однакові результати і можуть бути використані для визначення кількісного вмісту фенілефрину гідрохлориду при дослідженні стабільності.

5. Верифікована методика кількісного визначення цинку оксиду в мазі Симановського методом комплексонометрії. Отримані параметри лінійності відповідають встановленим критеріям, систематична похибка не перевищує критерій практичної незначущості ( $\delta=0.51 \% \leq 1.02 \%$ ), виконуються вимоги до величини однобічного довірчого інтервалу ( $\Delta_Z \leq \Delta_{As}$   $1.13 \leq 3.20$ ). Проведене

вивчення відтворюваності результатів кількісного визначення цинку оксиду в мазі ( $RSD=0.37\%$ ) свідчить про можливість коректного відтворення методики в інших лабораторіях.

6. Проведена оцінка мікробіологічної чистоти мазі протягом місяця при зберіганні за температури  $5\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Отримані результати свідчать про відсутність в мазі бактерій *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*. Загальне число мікроорганізмів та грибів не перевищує 10 КУО/г, що свідчить про збереження мікробіологічної чистоти мазі протягом 30 днів.

7. Досліджено ступінь зміни структурно-механічних властивостей мазі протягом тридцяти днів. Отримані значення в'язкості, механічної стабільності, площі гістерезису та коефіцієнтів динамічного розрідження свідчать про їх незначні зміни протягом всього періоду дослідження.

8. Проведене вивчення фізико-хімічної стабільності мазі протягом місяця. Отримані результати свідчать про стабільність кількісного вмісту АФІ мазі (фенілефрину гідрохлориду, цинку оксиду та ментолу).

9. Отримані результати досліджень стабільності мазі свідчать про її відповідність встановленим вимогам ДФУ до мазей аптечного виготовлення та дозволяють збільшити термін її зберігання до 30 днів при зберіганні за температури  $5\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

1. Оцінка мікробіологічної стабільності екстемпоральної мазі для назального застосування / К. А. Умінська, О. П. Стрілець, Л. П. Савченко, В. А. Георгіянц. *Зб. наук. праць співробіт. НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2015. Вип. 24, кн. 5. С. 366-370. (Особистий внесок – брала участь в узагальненні і обробці результатів та підготовці статті).
2. Development and validation of a gas chromatographic method for the menthol assay in compounding ointment / L. P. Savchenko, L. Ivanauskas, K. A. Uminska, Z. Barsteigiene, V. A. Georgiyants. *Journal of Pharmaceutical*

- Sciences and Research*. 2018. Vol. 10 (3). P. 450-453. (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
3. Selection and verification of the method for phenylephrine hydrochloride assay in Simanovsky ointment / L. Savchenko, K. Uminska, N. Bevz, V. Georgiyants. *Scientific Journal «Science Rise: Pharmaceutical Science»*. 2018. Vol. 1 (11). P. 26-31. (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, узагальненні і обробці результатів та підготовці статті).
  4. Savchenko L. P., Uminska K. A., Georgiyants V. A. Verification of the zinc oxide assay method in Simanovsky ointment for its chemical stability estimation. *International Journal For Research In Biology & Pharmacy*. 2018. Vol. 4, Is. 3. P. 23-31. (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, узагальненні і обробці результатів та підготовці статті).
  5. Спосіб кількісного визначення ментолу в складі комбінованої екстемпоральної мазі методом газової хроматографії / Л. П. Савченко, К. А. Умінська, Л. Іванаускас, В. А. Георгіянц: пат. 126228 на корисну модель України: МПК G01N 30/00, А61К 31/01, А61К 9/06. № u 2018 00041; заявл. 02.01.2018; опубл. 11.06.2018, Бюл. № 11 (Особистий внесок – брала участь в патентному пошуку, проведенні експериментальних досліджень та оформленні патенту).
  6. Савченко Л. П., Умінська К.А., Георгіянц В. А. Контроль якості мазі Симановського аптечного виготовлення. К., 2018. Вип. 6. 6 с. (Рішення ЕПК “Фармація” Протокол № 103 від 25.10.2017 р.) (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, узагальненні і обробці результатів та оформленні листа).
  7. Сучасні підходи до контролю якості м’яких лікарських форм аптечного виготовлення / Л. П. Савченко, К. А. Умінська, В. О. Вракін, В. А. Георгіянц. *Аналітична хімія у фармації*: мат. міжнародної науково-практичної конференції, Харків, 19-20 березня 2015 р. Харків, 2015. С. 73-75.

8. Савченко Л. П., Умінська К. А., Георгіянц В. А. Розробка методики кількісного визначення ментолу в екстемпоральній мазі. *Управління якістю в фармації*: мат. XI науково-практичної конференції, Харків, 19 травня 2017 р. Харків, Вид-во НФаУ, 2017. С. 153.
9. Умінська К. А., Савченко Л. П., Георгіянц В. А. Дослідження хімічної стабільності мазі Симановського. *Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій*: тези доповідей Всеукр. Наук.-практ. конф. З між нар. участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича, Харків, 12-13 квітня 2018. Харків, НФаУ, 2018. С. 351.

## ВИСНОВКИ:

В дисертаційній роботі проведено експериментальне вирішення наукової задачі щодо розробки методик для контролю якості та визначення стабільності комбінованих екстемпоральних мазей з настоянками календули, евкаліпту та ментолом.

1. На основі аналізу літературних даних обґрунтоване використання хроматографічних методик для ідентифікації і кількісного визначення рослинних компонентів екстемпоральних мазей та дослідження їх стабільності.

2. Розроблена методика ідентифікації рослинних компонентів мазі з настоянкою евкаліпту методом ГХ-МС, ідентифіковано шість сполук рослинного походження, які можуть бути використані для контролю якості мазі та вивчення її стабільності. Для дослідження стабільності мазі розроблена та валідована методика визначення 1,8-цинеолу методом ГХ-ПД. Визначені параметри придатності системи відповідають вимогам, як і значення валідаційних характеристик. Залишкове стандартне відхилення склало 1.71 ( $\leq 1.77$ ), коефіцієнт кореляції  $r$  0.9999 ( $\geq 0.9916$ ), систематична похибка методики 0.94 ( $\leq 1.02$ ). Збіжність результатів оцінена шляхом проведення чотирьох паралельних аналізів розчину мазі (RSD,  $\% = 0.68 \leq 1.92$  %).

3. Розроблена методика ГХ-ПФА мазі з настоянками календули та евкаліпту. Обрано оптимальний розчинник для аналізу мазі – хлороформ.  $\alpha$ -Пінен,  $\beta$ -пінен та 1,8-цинеол рекомендовано використовувати як маркери в подальшому контролі якості і вивченні стабільності мазі. Розроблена методика аналізу мазі методом ГХ-МС. В хлороформному розчині ідентифіковано 9 сполук-маркерів.

4. Розроблена та валідована методика кількісного визначення ментолу в мазі Симановського методом ГХ-ПД з використанням колонки  $30 \text{ м} \times 0.25 \text{ мм} \times 0.25 \text{ мкм}$ . Час утримування ментолу склав 8.00 хв. Параметри придатності системи відповідають вимогам ДФУ. Валідаційні параметри методики задовольняють вимоги: залишкове стандартне відхилення  $S_0 = 1.49 \leq 1.87$ , коефіцієнт кореляції  $r = 0.9999 \geq 0.9985$ , систематична похибка  $\delta$ ,  $\% = 0.87 \leq 1.02$ , односторонній довірчий

інтервал  $\Delta_Z$ ,  $\%=0.38 \leq 3.20$ . МВ ментолу склала  $2.51 \times 10^{-7}$  г/мл, а МКВ –  $7.58 \times 10^{-7}$  г/мл. Розраховане середнє значення кількісного вмісту ментолу в мазі 0.0398 г (99.50 %) відповідає вимогам ДФУ.

5. Верифікована методика кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду в мазі Симановського методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області за довжини хвилі 273 нм. Знайдене значення питомого показника поглинання ( $A_{1\text{см}}^{1\%} = 92 \pm 1,73$ ), яке відповідає літературним даним. Доведено, що методика є специфічною ( $\delta_{\text{noise}}$ ,  $\%=0.47 \leq 1.02$ ), розчини є стабільними в часі ( $\Delta_{\text{випр.}}$ ,  $\%=0.22$  та  $\Delta_{\text{тпор.}}$ ,  $\%=0.27 \leq 1.02$ ). Розраховані валідаційні параметри методики відповідають встановленим критеріям. Шляхом оцінки метрологічних характеристик доведено, що розрахунок кількісного вмісту фенілефрину гідрохлориду в мазі може проводитись методами стандарту або питомого показника поглинання. Кількісний вміст фенілефрину гідрохлориду в мазі відповідає вимогам ДФУ.

6. Верифікована методика кількісного визначення цинку оксиду в мазі Симановського методом комплексонометрії. Розраховані валідаційні параметри методики підтверджують можливість її використання для визначення кількісного вмісту цинку оксиду в досліджуваній мазі. Значення відносного стандартного відхилення результатів кількісного визначення відповідає вимогам (RSD,  $\%=0.37$ ). Середнє значення вмісту цинку оксиду в мазі склало 0.238 г (99.17 % від номінального), що відповідає вимогам ДФУ.

7. Проведена оцінка хімічної стабільності мазі Симановського з використанням розроблених методик. Отримані значення кількісного вмісту АФІ мазі свідчать про його стабільність протягом місяця при зберіганні за температури  $5 \pm 3$  °С.

8. Досліджено мікробіологічну чистоту мазей методами двошарового та глибинного висівання і проведено оцінку структурно-механічних властивостей мазей протягом тридцяти днів (на 10-й, 20-й та 30-й день зберігання за

температури  $5 \pm 3$  °С). Доведено відповідність мазей вимогам ДФУ за показником мікробіологічна чистота та відповідність встановленим реологічним параметрам.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:**

1. Валиев А. Х., Здорик А. А. Анализ и пути расширения ассортимента экстемпоральных лекарственных средств в Республике Таджикистан. *Science Rise*. 2015. № 11/4 (16). С. 55-59.
2. Визначення ментолу у льодяниках “Травісил” / В. Ракс, Є. Моторикін, В. Левчик, В. Зайцев. *Вісник Київського національного університету ім. Т. Шевченка*. 2013. № 1 (49). С. 35-38.
3. Газохроматографические профили летучих компонентов равновесной паровой фазы лекарственных растений «календула лекарственная», «зверобой продырявленный», «пижма обыкновенная». / Н. В. Ермакова и др. Сорбционные и хроматографические процессы. 2016. Т. 16. № 1. С. 17-28.
4. Гризодуб А. И. Валидация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ. *Фармаком*. 2002. №3. С.42-50.
5. Гризодуб А. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. *Фармаком*. 2006. № 1/2. С. 35-44.
6. Гризодуб А. И., Леонтьев Д. А., Денисенко Н. В. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта. *Фармаком*. 2004. № 3. С. 3-17.
7. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. 2-е вид. Х.: ДП “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”, 2014. Т. 2. 724 с.
8. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. 2-е вид. Х.: ДП “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”, 2014. Т. 1. 1128 с.
9. Державна Фармакопея України: в 3 т. / ДП “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. 2-е вид. Х.: ДП “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”, 2014. Т. 3. 732 с.



10.Державний реєстр лікарських засобів України. Інформаційний фонд. Режим доступу: <http://www.drlz.com.ua/>. (дата звернення 10.05.2018).

11.Дослідження реологічних властивостей вагінального крему з ефірною олією чебрецю / Н. В. Мельникова та ін. Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2010. Випуск XXIII, № 4. С. 46-47.

12.Евтифеева О. А., Георгианц В. А. Стандартизованная процедура валидации методик количественного определения экстемпоральных лекарственных средств в условиях аптек и лабораторий по контролю качества. Фармаком. 2007. № 1. С. 69-81.

13.Евтифеева О. А., Георгианц В. А. Титриметрический метод анализа в условиях аптек и лабораторий по контролю качества лекарственных средств: проблемы и подходы. Фармаком. 2008. № 2. С. 65-77.

14.Екстемпоральні мазі: аналіз якості за сучасними вимогами / Л. П. Савченко, К. А. Умінська, В. О. Вракін, В. А. Георгіянц. Фармація ХХІ століття: тенденції та перспективи: мат. VIII Національного з'їзду фармацевтів України, Харків, 13-16 вересня 2016 р. У 2 т., Т. 1., Харків, Вид-во НФаУ, 2016. С. 210.

15.Изучение консистентных свойств геля для профилактики и терапии алопеций / С. А. Гладышева, Е. В. Гладух, И. А. Пухальская, В. В. Нагорный. Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2010. Випуск XXIII, № 1. С. 30-32.

16.Использование метода газовой хроматографии с масс-детектором для изучения стабильности экстемпоральных мазей / Л. П. Савченко, Е. А. Уминская, В. А. Георгианц, Л. Иванаускас, Н. Б. Саидов. Наука и инновация. 2017. № 3. С. 36-38.

17.Комарова Ю. А., Крупа Н. А., Товмасын Э. К. Стандартная рабочая методика. Порядок проведения верификации аналитических методик количественного определения в исследовательских лабораториях. ГП “Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств”, 2011, 24 с.

18.Компендіум. Лікарські засоби. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/atc/>. (дата звернення 10.05.2018).

19.Контроль мікробіологічної чистоти мазей аптечного виготовлення як гарантія їх безпеки та якості / Л. П. Савченко, К. А. Умінська, В. О. Вракін, В. А. Георгіянц, О. П. Стрілець. Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку: мат. І науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю, Харків, 24-25 березня 2016 р. Харків, 2016. С. 169-170.

20.Коритнюк Р. С., Власенко І. О., Руденко В. В. Шляхи удосконалення виготовлення лікарських засобів в умовах аптек. Фармацевтичний часопис. 2007. № 1. С. 44-48.

21.Кулешова М. И., Гусева Л. Н., Сивицкая О. К. Анализ лекарственных форм, изготавливаемых в аптеках. М.: Медицина, 1989. 228 с.

22.Кухтенко Г. П., Ляпунова О. О., Лисокобилка О. А. Вивчення структурно-механічних властивостей крему на основі емульсії І роду. Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2012. № 3 (10). С. 83-87.

23.Методы анализа лекарств / Н. П. Максютин, Ф. Е. Каган, Л. А. Кириченко, Ф. А. Митченко. К. : Здоров'я, 1984. 224 с.

24.Некоторые вопросы реологии мягких лекарственных форм / Р. С. Корытнюк, Г. В. Загорий, В. А. Тарасенко, У. Чинамере. Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. 2012. Вип. 21, кн. 4. С. 430-438.

25.Определение фенольных соединений и флавоноидов в водных экстрактах лекарственных растений / З. А. Темердашев, Н. А. Фролова, И. А. Колычев, Т. Г. Цюпко. Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2011. № 11, том 77. С. 22-26.

26.Оцінка мікробіологічної стабільності екстемпоральної мазі для назального застосування / К. А. Умінська, О. П. Стрілець, Л. П. Савченко, В. А. Георгіянц. Зб. наук. праць співробіт. НМАПО ім. П. Л. Шупика. 2015. Вип. 24, кн. 5. С. 366-370.

27. Попович В. П., Глущенко О. М., Хоменко С. Л. Фармацевтичний ринок м'яких лікарських форм. Фармацевтичний часопис. 2013. № 4. С. 68-71.

28. Порівняння фармакопейних підходів до контролю якості мазей аптечного виготовлення / Л. П. Савченко, В. А. Георгіянц, К. А. Умінська, В. О. Вракін. Управління якістю в фармації: мат. VI науково-практичної конференції з міжнародною участю, Харків, 17 квітня 2013 р. Харків, 2013. С. 114.

29. Про затвердження Правил виробництва (виготовлення) та контролю якості лікарських засобів в аптеках МОЗ України: Наказ від 17.10.2012 № 812 URL: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/z1846-12>. (дата звернення 10.05.2018).

30. Пухлик Б. М. Ситуация с аллергическими заболеваниями и аллергологией в Украине. Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. 2013. № 2. С. 5-8.

31. Савченко Л. П., Умінська К. А., Георгіянц В. А. Контроль якості мазі Симановського аптечного виготовлення. К., 2018. Вип. 6. 6 с. (Рішення ЕПК “Фармація” Протокол № 103 від 25.10.2017 р.)

32. Савченко Л. П., Уминская Е. А., Георгіянц В. А. Headspace анализ в исследовании экстенпоральной мази с растительными настойками. Медичні науки: напрямки та тенденції розвитку в Україні та світі: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, Одеса, 16-17 червня 2017 р. Одеса, ГО “Південна фундація медицини”, 2017. С. 20-21.

33. Савченко Л. П., Умінська К. А., Георгіянц В. А. Використання методу Headspace для експрес-аналізу екстенпоральної мазі з настойками календули та евкالیпту. Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. 2017. Вип. 28. С. 115-122.

34. Савченко Л. П., Умінська К. А., Георгіянц В. А. Розробка методики кількісного визначення ментолу в екстенпоральній мазі. Управління якістю в фармації: мат. XI науково-практичної конференції, Харків, 19 травня 2017 р. Харків, Вид-во НФаУ, 2017. С. 153.

35. Сметаніна К. І. Сучасні аспекти екстенпорального виготовлення ліків для геріатричних хворих. Ліки України. 2015. № 2 (23). С. 17-18.

36.Спосіб кількісного визначення ментолу в складі комбінованої екстемпоральної мазі методом газової хроматографії / Л. П. Савченко, К. А. Умінська, Л. Іванаускас, В. А. Георгіянец: пат. 126228 на корисну модель України: МПК G01N 30/00, A61K 31/01, A61K 9/06. № u 2018 00041; заявл. 02.01.2018; опубл. 11.06.2018, Бюл. № 11.

37.Сучасні підходи до контролю якості м'яких лікарських форм аптечного виготовлення / Л. П. Савченко, К. А. Умінська, В. О. Вракін, В. А. Георгіянец. Аналітична хімія у фармації: мат. міжнародної науково-практичної конференції, Харків, 19-20 березня 2015 р. Харків, 2015. С. 73-75.

38.Улізко І. В., Трохимчук В. В., Чуєшов В. І. Реологічні характеристики гелів на основі гідроксиетилцелюлози. Scientific Journal "Science Rise: Pharmaceutical Science". 2016. № 3 (3). С. 44-48.

39.Умінська К. А., Савченко Л. П., Георгіянец В. А. Дослідження хімічної стабільності мазі Симановського. Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій: тези доповідей Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича, Харків, 12-13 квітня 2018. Харків, НФаУ, 2018. С. 351.

40.Фармацевтические и биологические аспекты мазей: Монография / Под ред. И. М. Перцева. Х.: Изд-во НФаУ: Золотые страницы, 2003. 288 с.

41.Фармацевтична енциклопедія: Цинку оксид (Zinci oxydum). Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/142/cinku-oksid>. (дата звернення 10.05.2018).

42.Фармацевтична хімія: навч. посіб. / за заг. ред. П. О. Безуглого. Вінниця: НОВА КНИГА, 2006. 552 с.

43.Хаджиева З. Д., Губанова Л. Б., Теунова Е. А. Разработка методик качественного и количественного анализа фенолоальдегидов мази хлорофиллипта. Современные проблемы науки и образования. 2011. № 2. С. 1-5.

44.Хроматографические спектры удерживания летучих компонентов равновесной паровой фазы лекарственных растений "Эвкалипт прутовидный",

”Мелисса лекарственная”, ”Софора японская” / Л. А. Онучак и др. Вестник СамГУ. 2014. № 10 (121). С. 153-165.

45.Хромато-масс-спектрометрический анализ эвкалипта прутовидного (*Eucalypti viminalis* Labill.) с использованием различных способов пробоподготовки / Л. В. Павлова, И. А. Платонов, Е. А. Новикова, Н. В. Никитченко. Аналитика и контроль. 2013. Т. 17. № 3. С. 304-313.

46.A generic method for the analysis of residual solvents in pharmaceuticals using static headspace-GC-FID/MS / K. Jacq, F. David, P. Sandra, M. S. Klee. Application note. USA: Agilent Technologies, 2008. 12 p.

47.A rapid HPLC method for the quantification of tyrothricin, menthol and benzocaine in pharmaceutical formulations / I. Caraballo, M. Fernandezy, M. A. Holgado, M. T. Vela, A. M. Rabasco. J. Pharma. Sci. 1994. Vol. 83, 8. P. 1147-1149.

48.A Technical Guide for Static Headspace Analysis Using GC. Technical Guide. Bellefonte, USA: Restek Corporation, 2000. 20 p.

49.Al-Abachi Q. M., Abed S. S. Spectrophotometric determination of phenylephrine hydrochloride and salbutamol sulphate drugs in pharmaceutical preparations using diazotized metoclopramide hydrochloride. Baghdad Science Journal. 2015. Vol. 12 (1). P. 167-177.

50.Aldulaimi O. A., Wen-Wu Li. Fingerprint of Tiger Balm by thermal desorption Gas Chromatography Mass Spectrometry. Pharmacognosy Journal. 2016. Vol. 8, Issue 3.

51.Al-Snafi A. E. The chemical constituents and pharmacological effects of *Calendula officinalis* – a review. Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research. 2015. Vol. 5, Issue 3. P. 172-185.

52.An innovative ointment made of natural ingredients with increased wound healing activity / A. Zbucnea et al. Romanian Biotechnological Letters. 2016. Vol. 21, No. 1. P. 11176-11185.

53.An investigation of CO<sub>2</sub>-extraction of marigold (*Calendula officinalis* L.) / L. Petrović et al. J. Serb. Chem. Soc. 2007. Vol. 72 (4). P. 407-413.

54. Analysis of menthol in three traditional Chinese medicinal herbs and their compound formulation by GC-MS / R. Lin, J. Tian, G. Huang, T. Li, F. Li, *Biomed. Chromatogr.* 2002. Vol. 16, 3. P. 229-233.

55. Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures / Z. C. Gazim et al. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2008. Vol. 44, Issue 3. P. 391-395.

56. Analytical method development and validation of pain relief herbal formulations / R. J. Shah, A. I. Patel, K. V. Vikani, N. L. Patel. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research.* 2016. Vol. 6, Issue 4. P. 5112-5117.

57. Antibacterial activity of Eucalyptus extracts on methicillin resistance *Staphylococcus aureus* / F. M. Nezhad et al. *Research Journal of Biological Sciences.* 2009. Vol. 4 (8). P. 905-908.

58. Antifungal activity and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) leaf oil analysis of essential oils extracted from *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) of north centre region of Morocco / E. Derwich, Z. Benziane, R. Chabir, A. Bouseta. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2013. Vol. 7(19). P. 1157-1162.

59. Antimicrobial activity of aqueous, acetone and methanol extracts of *Calendula officinalis* L. (Marigold) flower / P. Chandurkar et al. *International Journal of Pure & Applied Bioscience.* 2015. Vol. 3 (2). P. 386-388.

60. Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro / B. Damjanovic-Vratnica, T. Dakov, D. A. Sukovic, J. Damjanovic. *Czech J. Food Sci.* 2011. Vol. 29, No. 3. P. 277-284.

61. Antimicrobial potential of five medicinal plant extracts against three pathogenic bacteria / S. Ambarish et al. *The Bioscan.* 2011. Vol. 6 (3). P. 455-458.

62. Assessment report on *Eucalyptus globulus* Labill., folium 27 March 2012 EMA/HMPC/892615/2011 Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) European Medicines Agency, 2012. London 26 p.

63. Bachheti R. K. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from the leaves of *Eucalyptus Globulus* collected from Haramaya University, Ethiopia. *Der Pharma Chemica*. 2015. Vol. 7 (2). P. 209-214.

64. Bernal E. Determination of volatile substances in forensic samples by static headspace gas chromatography. *Gas chromatography in plant science, wine technology, toxicology and some specific applications*. Ed. by Dr. B. Salih. In Tech Europe, 2012. Ch. 10. P. 197-224.

65. Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities / A. Elaissi et al. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012. Vol. 12 (81). 15 p.

66. Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis* / M. V. Maciel et al. *Veterinary Parasitology*. 2010. Vol. 167. P. 1-7.

67. Chemical composition of scented extracts obtained from *Calendula officinalis* by three extraction methods / L. F. Salome-Abarca, R. M. Soto-Hernandez, N. Cruz-Huerta, V. A. Gonzalez-Hernandez. *Botanical Sciences*. 2015. Vol. 93 (3). P. 633-638.

68. Comparative account on GC-MS analysis of *Mentha arvensis* L. corn mint. from three different locations of North India / V. Sharma et al. *International Journal of Drug Dev & Res*. 2009. Vol. 1(1). P. 1-9.

69. Comparative evaluation of four spectrophotometric methods for the simultaneous determination of paracetamol and phenylephrine hydrochloride in fixed dose pharmaceutical formulations / D. V. Chavada, M. N. Bhatt, M. Sanyal, S. P. Shrivastav. *Physical Chemistry*. 2015. Vol. 17(1). P. 6-15.

70. Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*) / Peeyush K., Sapna M., Anushree M., Santosh S. *Acta Tropica*. 2012. Vol. 122. P. 212-218.

71. Compounding as a current therapeutic option in dermatology / M. Sánchez-Regana et al. *Actas Dermosifiliogr*. 2013. Vol. 104 (9). P. 738-756.

72. Compounding practices in Queensland: Experiences and Perceptions of Pharmacists and Pharmacy Students / TL L. Esther et al. *Journal of Pharmacy Practice and Research*. 2013. Vol. 43, No. 1. P. 19-24.

73. Daniel H. C., Lacy M. A. Topical menthol increases cutaneous blood flow. *Microvascular Research*. 2016. Vol. 107. P. 39-45.

74. Determination of additives in cigarettes utilizing evolved Gas Analysis (EGA) / K. Ferguson et al. *Food and Public Health*. 2016. Vol. 6 (2). P. 33-37.

75. Determination of l-Menthol in pharmaceutical products by high performance liquid chromatography with polarized photometric detection / K. Hamasaki et al. *J. Pharma. Biomed. Anal.* 1998. Vol. 16, 8. P. 1275-1280.

76. Development and validation of a gas chromatographic method for the menthol assay in compounding ointment / L. P. Savchenko, L. Ivanauskas, K. A. Uminska, Z. Barsteigiene, V. A. Georgiyants. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. Vol. 10 (3). P. 450-453.

77. Development and validation of chromatographic methods (HPLC and GC) for the determination of the active components (benzocaine, tyrothricin and menthol) of a pharmaceutical preparation / F. Ortiz-Boyer, M. T. Tena, M. D. Luque de Castro, M. Valcarcel. *J. Pharma. Biomed. Anal.* 1995. Vol. 13, 11. P. 1297-1303.

78. Development and validation of the GC method for the chemical stability estimation of the compounding ointment with Eucalyptus tincture / V. Georgiyants, L. Savchenko, K. Uminska, L. Ivanauskas. *ChemCYS 2018: Chemistry Conference for Young Scientists*, Blankenberge, Belgium, 21-23 February 2018. Blankenberge, 2018. P. 63.

79. Dibbern H.-W., Muller R. M., Wirbitzki E. *UV and IR spectra. Pharmaceutical Substances (UV and IR) and Pharmaceutical and Cosmetic Excipients (IR)*. Aulendorf: Editio Cantor Verlag, ECV, 2002, 1764 p.

80. Direct determination of menthol using a simple spectrophotometric method / A. Anastasia-Sandu, S. Birzu, I. Diiu, L. Bulgariu. *Buletinul Institutului Politehnic din Iasi Lix*. 2013. Vol. LXIII, Is. 2. P. 71-80.



81.Eccles R., Hull D. Vicks VapoRub shows its speed. Режим доступу: [www.scientiapublications.com](http://www.scientiapublications.com). (дата звернення 10.05.2018).

82.Effect of Essential Oil Isolated from Eucalyptus globulus Labill. from Montenegro. Czech J. Food Sci. 2011. Vol. 29, No. 3. P. 277-284.

83.Effect of menthol absorption by packaging material on the quality of yogurt drink during storage time / M. Farhoodi et al. J. Agr. Sci. Tech. 2013. Vol. 15. P. 1373-1380.

84.Elzorba H., Banna El H., Derbala D. Some toxicological and pharmacological activities of Calendula officinalis Linn. flower 70 % ethanolic extract. Animal and Veterinary Sciences. 2016. Vol. 4 (2). P. 26-31.

85.Enantiomeric analysis of (+)-menthol and (-)-menthol by fluorogenic derivatization and liquid chromatography / Y. T. Lin et al. A Journal of Chromatography. 2005. Vol. 1087, 1-2. P. 223-228.

86.Encyclopedia of pharmaceutical technology. Ed. by J. Swarbrick. 3 rd ed. NY: Informa healthcare USA, Inc., 2007, 4372 p.

87.Essential oil of Calendula officinalis / V. Abdullabekova, A. Juraeva, O. Azizov, N. Yunusxodjaeva. European Medical, Health and Pharmaceutical Journal. 2014. Vol. 7, Is. 2. P. 34-37.

88.Eucalyptus. Provital group. Centerchem, Norwalk, 2011. 8 p.

89.European Pharmacopoeia, 8th ed, Vol. 2, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe, Strasbourg, 2013.

90.European Pharmacopoeia. 6-th ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2008. Vol. 1. 1084 p.

91.Extemporaneous compounding practice by pharmacists: a systematic review / K. Susi Ari, W. Chairun, W. Nur Niken, A. Hardika. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2017. Vol. 9, Issue 2. P. 42-46.

92.Extemporaneous dispensing – comparative analysis between Greece and Bulgaria / M. Dimitrov et al. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2015. Vol. 4, Is. 03. P. 01-09,

93.Extraction of thymol, eucalyptol, menthol, and camphor residues from honey and beeswax: determination by Gas Chromatography with flame ionization detection / M. J. Nozal et al. *A Journal of Chromatography*. 2002. Vol. 954, 1-2. P. 207-215.

94.Extraction of volatile organic compounds from solids and liquids / G. C. Slack, N. H. Snow, D. Kou. *Sample preparation techniques in analytical chemistry* / S. Mitra. John Wiley & Sons, Canada, 2003. P. 183-225.

95.Farahpour M. R. Antioxidant activity, antinociceptive and anti-inflammatory effects of Pot marigold hydroalcoholic extract on experimental animals. *Int. Jour. of Pharm. Tech Research*. 2014. Vol. 6, N. 5. P. 1640-1646.

96.Flavors and aromas. Menthol analysis in peppermint oil. Agilent Technologies, Inc. Application Note USA, 2011. 2 p.

97.Frequency, nature and determinants of pharmacy compounded medicines in Dutch community pharmacies / H. Buurma et al. *Pharm. World Science*. 2003. Vol. 25. P. 280-287.

98.GC method validation for the analysis of menthol in suppository pharmaceutical dosage form / M. N. Abualhasan, A. N. Zaid, N. Jaradat, A. Mousa. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2017. Article ID 1728414. 5 p.

99.Giam J. A., McLachlan A. J., Krass I. Characterizing specialized compounding in community pharmacies. *Res. Soc. Adm. Pharm.* 2012. Vol. 8 (3). P. 240-252.

100. Gladukh Ie., Grubnik I., Kukhtenko H. Structural-mechanical studies of phytogel “Zhivitan”. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2017. Vol. 9 (10). P. 1672-1676.

101. Glavas M. D., Kulevanova S. A review of phytotherapy of acne vulgaris. *Macedonian pharmaceutical bulletin*. 2009. Vol. 55 (1, 2). P. 3-22.

102. Gupta P., Garg S. Recent advances in semisolid dosage forms for dermatological application. *Pharmaceutical Technology*. 2002. March. P. 144-162.

103. Identification of Calendula and Eucalyptus alcoholic tinctures volatile compounds in the compounding ointment by Gas chromatography-mass spectrometry.

L. P. Savchenko, L. Ivanauskas, K. A. Uminska, V. A. Georgiyants. Asian Journal of Pharmaceutics. 2018. Vol. 12 (1), Suppl. Issue. P. 145-150.

104. Identification of volatile compounds in hydro-alcoholic extracts of *Calendula officinalis* L. flowers and *Mimosae tenuiflorae* bark using GC/MS / I. O. Caamal-Herrera, D. Muñoz-Rodríguez, T. Madera-Santana, J. A. Azamar-Barrios. International Journal of Applied Research in Natural Products. 2016 Vol. 9 (1). P. 20-30.

105. In vitro and in vivo assessment of polyherbal topical gel formulation for the treatment of acne vulgaris / P. Nand et al. International Journal of Drug Delivery. 2012. Vol. 4. P. 434-442.

106. Indian Pharmacopoeia / The Indian Pharmacopoeia Commission [Электронный ресурс]. Ghaziabad, 2007. Vol. 2. P. 619-1406.

107. Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia / G. Rigane, B. S. Younes, H. Ghazghazi, B. R. Salem. Int. Food Research Jour. 2013. Vol. 20 (6). P. 3001-3007.

108. Jiménez-Carmona M. M., Luque de Castro M. D. Isolation of Eucalyptus essential oil for GC-MS analysis by extraction with subcritical water. Chromatographia. 1999. Vol. 50, No. 9/10. P. 578-582.

109. Kalgutkar R., Ramakrishna K., Srinivasarao V. Method development and validation of menthol in cough syrup by gas chromatography. Analytical Chemistry An Indian Journal. 2016. Vol. 16 (1). P. 001-006.

110. Khalid A. Khalid, Teixeira de Silva J. A. Biology of *Calendula officinalis* Linn.: focus on pharmacology, biological activities and agronomic practices. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology. 2012. Vol. 6(1). P. 12-17.

111. Khalid A. Khalid. Effect of potassium uptake on the composition of essential oil content in *Calendula officinalis* L. flowers Emir. J. Food Agric. 2013. Vol. 25 (3). P. 189-195.

112. Kryvanych O. V., Bevz N. Yu., Georgiyants V. A. Development of the method for quantitative determination of phenylephrine hydrochloride in the combined drops. News of pharmacy. 2014. Vol. 4 (80). P. 17-21.

113. Kryvanych O. V., Bevz N. Yu., Georgiyants V. A. Verification of the quantitative determination method for phenylephrine hydrochloride in solution for injection. *Acta Chimica and Pharmaceutica Indica*. 2014. Vol. 4 (1). P. 1-6.

114. Krzek J., Czekaj J. S., Rzeszutko W. Validation of a method for simultaneous determination of menthol and methyl salicylate in pharmaceuticals by capillary gas chromatography with cool on-column injection. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. 2003. Vol. 60, N. 5. P. 343-349.

115. Lelesz J. É., Csajbók J. Relationship investigation between the Marigold (*Calendula officinalis* L.) essential oil agents and quantitative presences change under different fertilization settings. *Natural Resources and Sustainable Development*. 2016. P. 93-99.

116. Luca S. A., Ciucanu I. Solid-phase microextraction of menthol from peppermint. *Annals of West University of Timisoara. - Series of Chemistry*. 2011. Vol. 20 (1). P. 71-80.

117. Masupye E. M., Suleman F., Govender T. Investigating extemporaneous compounding practices in the Polokwane tertiary hospital pharmacies in South Africa - a pilot study. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2015. Vol. 9 (48). P. 1099-1105.

118. May P., Quirin K.-W. Supercritical Marigold flower CO<sub>2</sub>-extract - evergreen in evidence based cosmetic application. *Cosmetic Science Technology*. 2014. P. 19-25.

119. Mazurek S., Szostak R. Quantitative analysis of topical gels and ointments by FT-Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. 2016. Vol. 83. P. 1-7.

120. Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties / G. P. P. Kamatou, I. Vermaak, A. M. Viljoen, B. M. Lawrence. *Phytochemistry*. 2013. Vol. 96. P. 15-25.

121. Mishra A. K., Mishra A., Chattopadhyay P. Assessment of in vitro sun protection factor of *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) essential oil –formulation. *Journal of Young Pharmacists*. 2012. Vol. 4, № 1. P. 17-21.

122. Muley B. P., Khadabadi S. S., Banarase N. B. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2009. Vol. 8 (5). P. 455-465.

123. Okoh O. O., Sadimenko A. A., Afolayan A. J. The effects of age on the yield and composition of the essential oils of *Calendula officinalis*. *J. of Applied Sciences*. 2007. Vol. 7 (23). P. 3806-3810.

124. Orav A., Kann J. Determination of peppermint and orange aroma compounds in food and beverages. *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem*. 2001. Vol. 50, 4. P. 217-225.

125. Orav A., Raal A., Arak E. Comparative chemical composition of the essential oil of *Mentha piperita* L. from various geographical sources. *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem*. 2004. Vol. 53. 4. P. 174-181.

126. Pallavi L. Pawar, Bela M. Nabar Effect of plant extracts formulated in different ointment bases on MDR strains. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010. May-June. P. 397-401.

127. Pappas A., MacPherson R., Stewart K. Extemporaneous prescribing: whatever happened to it? A survey of Australian general practitioners. *Journal of Pharm. Pract. Resource*. 2002. Vol. 32 (31). P. 0-4.

128. Petersen D. Top 5 Ways to check quality of essential oils: Gas Chromatography (GC), Mass Spectrometry (MS), Latin, Organoleptic Testing & Knowing Your Supplier. Электронный ресурс. Режим доступа: <http://info.achs.edu/blog/bid/316901/top-5-ways-to-check-quality-of-essential-oils-gas-chromatography-gc-mass-spectrometry-ms-latin-organoleptic-testing-knowing-your-supplier>. (дата звернення 10.05.2018).

129. Petrović, L., Lepojević, Z., Sovilj, V. Composition of essential oil obtained from tubular, head and ligulate flowers of *Calendula officinalis* L. By steam distillation of plant material and CO<sub>2</sub> extracts. *Journal of Essential Oil Research*. 2010. Vol. 22 (2). P. 143-146.

130. Practical approaches to plant volatile analysis / D. Tholl et al. *The Plant Journal*. 2006. Vol. 45. P.540-560.

131. Production and quality of menthol mint essential oil and antifungal and antigerminative activity / M. A. A. Souza et al. American Journal of Plant Sciences. 2014. Vol. 5. P. 3311-3318.

132. Quality assessment of the essential oil from *Eucalyptus globulus* Labill of Blida (Algeria) origin / M. N. Boukhatem et al. International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy. 2014. Vol. 17 (3). P. 303-315.

133. Quantitative analysis of menthol in human urine using solid phase microextraction and stable isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry / H. Wenlin et al. Journal of Chromatography B. 2017. Vol. 1044-1045. P. 200-205.

134. Raghad DH A. J. GC-MS analysis of *Calendula officinalis* and cytotoxic effects of its flower crude extract on human epidermoid larynx carcinoma (HEP-2). World Jour. of Pharmacy and Pharmaceutical sciences. 2014. Volume 3, Issue 4. P. 237-275.

135. Rekha S., Chandrashekhara S., Murugan V. Comparative study and antimicrobial activities of alcoholic and aqueous extracts of *Eucalyptus globulus*. World Jour. of Pharmacy and Pharmaceutical sciences. 2016. Vol. 5, Issue 9. P. 1678-1684.

136. Satyarum S. K., Deshmukh P. V. Antibacterial and antioxidant activity of flower extracts of aster and calendula sp. against skin pathogens. International Journal of Recent Trends in Science and Technology. 2016. Vol. 20, Issue 2. P. 197-200.

137. Savchenko L. P., Uminska K. A., Georgiyants V. A. Verification of the zinc oxide assay method in Simanovsky ointment for its chemical stability estimation. International Journal For Research In Biology & Pharmacy. 2018. Vol. 4, Is. 3. P. 23-31.

138. Savić I., Nikolić G., Banković V. Development and validation of spectrophotometric method for phenylephrine hydrochloride estimation in nasal drops formulation. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering. 2008. Vol. 27 (2). P. 149-156.

139. Selection and verification of the method for phenylephrine hydrochloride assay in Simanovsky ointment / L. Savchenko, K. Uminska, N. Bevz, V. Georgiyants. Scientific Journal «Science Rise: Pharmaceutical Science». 2018. Vol. 1 (11). P. 26-31.

140. Sengupta R. Combined wound healing activity of *Calendula officinalis* and Basil leaves. *Jour. of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2017. Vol. 6 (1). P. 173-176.
141. Shah P. P., D'Mello P. M. A review of medicinal uses and pharmacological effects of *Mentha piperita*. *Natural Product Radiance*. 2004. Vol. 3 (4). P. 214-221.
142. Shaikh K. A., Patil S. D. Sensitive and selective method for the analysis of menthol from pharmaceutical products by RP-HPLC with refractive index detector. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 2010. Vol. 2 (4). P. 360-364.
143. Shelke U. Y., Mahajan A. A. Review on: an ointment. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research*. 2015. Vol. 4 (2). P. 170-192.
144. Simultaneous GC determination of turpentine, camphor, menthol and methyl salicylate in a topical analgesic formulation (Dologex (R)) / E. Gonzalez-Penas et al. *Chromatographia*. 2000. Vol. 52. P. 245.
145. Song A., Wang Y., Liu Y. Study on the chemical constituents of the essential oil of the leaves of *Eucalyptus globulus* Labill from China. *Asian Journal of Traditional Medicines*. 2009. Vol. 4 (4). P. 134-140.
146. Stability studies of formulations containing Eucalyptus oil / N. Dawar, M. Arora, T. Naved, V. K. Tyagi. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013. Vol. 3 (3). P. 174-180.
147. Stability studies of compounding ointment with herbal tinctures / L. P. Savchenko, K. A. Uminska, V. A. Georgiyants, L. Ivanauskas. "Science and practice 2016": the 7<sup>th</sup> International Pharmaceutical Conference, Kaunas, Lithuania, 20-21 October, 2016. Kaunas, 2016. P. 43-44.
148. St-Gelais A. The highs and lows of GC-MS in essential oil analysis. Электронный ресурс. Режим доступа: <http://tisserandinstitute.org/highs-lows-gc-ms-essential-oil-analysis/>. (дата звернення 10.05.2018).
149. Studying of the compounding ointment with Eucalyptus tincture rheological parameters / L. P. Savchenko, K. A. Uminska, G. P. Kukhtenko, V. A. Georgiyants. *Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice: the 8<sup>th</sup> International Conference, Kaunas, Lithuania, 15 December, 2017*. Kaunas, 2017. P. 28-29.

150. Subhash K., Bhavesh B., Hemang V. Analytical method development and validation of menthol and methyl salicylate content in topical cream and gel by Gas Chromatography. *J. Chromatogr. Sep. Tech.* 2017. Vol. 8 (6). 4 p.
151. Sustrikova A., Šalamon I. Essential oil of peppermint (*Mentha piperita* L.) from fields in Eastern Slovakia. *Hort. Science.* 2004. Vol. (1). P. 31-36.
152. Tejesh P., Ishiujji Y., Yosipovitch G. Menthol: a refreshing look at this ancient compound. *Journal of American Acad. Dermatology.* 2007. Vol. 57 (5). P. 873-878.
153. The Japanese Pharmacopoeia [Электронный ресурс]. 15-th ed. / The National Institute of Health Sciences, 2007. 1788 p.
154. The United States Pharmacopoeia, 32-NF 27 [Электронный ресурс]. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2008.
155. Theia'a N. Al-Sabha. Spectrophotometric assay of phenylephrine hydrochloride using 4-aminoantipyrine and copper (II). *Pak. J. Anal. Environ. Chem.* 2010. Vol. 11, No. 1. P. 01-07.
156. Tipler A. An introduction to headspace sampling in gas chromatography: Fundamentals and theory. Waltham, USA: Perkin Elmer, 2013-2014. 34 p.
157. Topical antibiotics and Semisolid Dosage Forms / A. Mishra, R. Panola, B. Vyas, D. Marothia, H. Kansara. *International Journal of Pharmaceutical Erudition.* 2014. № 4 (3). P. 33-54.
158. USP compounding : A Guide for the Compounding Practitioner. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2012, 317 p.
159. USP Pharmacists' Pharmacopoeia: 2 nd ed. Rockville: The United State Pharmacopoeia, Inc., 2008. 1519 p.
160. Validated GC method for determination of Validol in tablet dosage forms / B. Tsvetkova, I. Pencheva, A. Zlatkov, P. Peikov. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 2012. Vol 5, Suppl 3. P. 96-97.
161. Wadher S. J., Kalyankar T. M., Panchal P. P. Development and validation of simultaneous estimation of chlorpheniramine maleate and phenylephrine



hydrochloride in bulk and capsule dosage form by Ultra-Violet Spectrophotometry. International Journal of ChemTech Research. 2013. Vol.5, No.5. P. 2410-2419.

162. Wankhede S. B., Lad K. A., Chitlange S. S. Development and validation of UV-spectrophotometric methods for simultaneous estimation of cetirizine hydrochloride and phenylephrine hydrochloride in tablets. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research. 2012. Vol. 4(3). P. 222-226.

163. Wong L. K., Reinertson E. L. Clinical considerations of dimethyl sulfoxide. Iowa State University Veterinarian. 1984. Vol. 46, № 2. P. 89-95.

**ДОДАТКИ**

## Додаток А

## Список публікацій здобувача

1. Оцінка мікробіологічної стабільності екстемпоральної мазі для назального застосування / К. А. Умінська, О. П. Стрілець, Л. П. Савченко, В. А. Георгіянц. *Зб. наук. праць співробіт. НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2015. Вип. 24, кн. 5. С. 366-370 (Особистий внесок – брала участь в узагальненні і обробці результатів та підготовці статті).
2. Савченко Л. П., Умінська К. А., Георгіянц В. А. Використання методу Headspace для експрес-аналізу екстемпоральної мазі з настойками календули та евкаліпту. *Зб. наук. праць співробіт. НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2017. Вип. 28. С. 115-122 (Особистий внесок – брала участь в проведенні експериментальних досліджень, узагальненні і обробці результатів та підготовці статті).
3. Development and validation of a gas chromatographic method for the menthol assay in compounding ointment / L. P. Savchenko, L. Ivanauskas, K. A. Uminska, Z. Barsteigiene, V. A. Georgiyants. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. Vol. 10 (3). P. 450-453 (Особистий внесок – брала участь в плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).
4. Identification of Calendula and Eucalyptus alcoholic tinctures volatile compounds in the compounding ointment by Gas chromatography-mass spectrometry. Lesia P. Savchenko, Liudas Ivanauskas, Kateryna A. Uminska, Victoriya A. Georgiyants. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2018. Vol. 12 (1), Suppl. Issue. P. 145-150 (Особистий внесок – брала участь в узагальненні і обробці результатів та підготовці статті).
5. Selection and verification of the method for phenylephrine hydrochloride assay in Simanovsky ointment / L. Savchenko, K. Uminska, N. Bevz, V. Georgiyants. *Scientific Journal «Science Rise: Pharmaceutical Science»*. 2018. Vol. 1 (11). P. 26-31 (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, узагальненні і обробці результатів та підготовці статті).

6. Savchenko L. P., Uminska K. A., Georgiyants V. A. Verification of the zinc oxide assay method in Simanovsky ointment for its chemical stability estimation. *International Journal For Research In Biology & Pharmacy*. 2018. Vol. 4, Is. 3. P. 23-31 (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, узагальненні і обробці результатів та підготовці статті).
7. Савченко Л. П., Умінська К. А., Іванаускас Л., Георгіянц В. А. Спосіб кількісного визначення ментолу в складі комбінованої екстемпоральної мазі методом газової хроматографії: пат. 126228 на корисну модель України: МПК G01N 30/00, A61K 31/01, A61K 9/06. № у 2018 00041; заявл. 02.01.2018; опубл. 11.06.2018, Бюл. № 11 (Особистий внесок – брала участь в патентному пошуку, проведенні експериментальних досліджень та оформленні патенту).
8. Савченко Л. П., Умінська К.А., Георгіянц В. А. Контроль якості мазі Симановського аптечного виготовлення. К., 2018. Вип. 6. 6 с. (Рішення ЕПК “Фармація” Протокол № 103 від 25.10.2017 р.) (Особистий внесок – брала участь в проведенні досліджень, узагальненні і обробці результатів та оформленні листа).
9. Порівняння фармакопейних підходів до контролю якості мазей аптечного виготовлення / Л. П. Савченко, В. А. Георгіянц, К. А. Умінська, В. О. Вракін. *Управління якістю в фармації*: мат. VI науково-практичної конференції з міжнародною участю, Харків, 17 квітня 2013 р. Харків, Вид-во НФаУ, 2013. С. 114.
10. Сучасні підходи до контролю якості м'яких лікарських форм аптечного виготовлення / Л. П. Савченко, К. А. Умінська, В. О. Вракін, В. А. Георгіянц. *Аналітична хімія у фармації*: мат. міжнародної науково-практичної конференції, Харків, 19-20 березня 2015 р. Харків, 2015. С. 73-75.
11. Контроль мікробіологічної чистоти мазей аптечного виготовлення як гарантія їх безпеки та якості / Л. П. Савченко, К. А. Умінська, В. О. Вракін, В. А. Георгіянц, О. П. Стрілець *Фармацевтична наука та практика*:

- проблеми, досягнення, перспективи розвитку: мат. I науково-практичної інтернет-конференції з міжнародною участю, Харків, 24-25 березня 2016 р. Харків, 2016. С. 169-170.
12. Екстемпоральні мазі: аналіз якості за сучасними вимогами / Л. П. Савченко, К. А. Умінська, В. О. Вракін, В. А. Георгіянец. *Фармація XXI століття: тенденції та перспективи*: мат. VIII Національного з'їзду фармацевтів України, Харків, 13-16 вересня 2016 р. У 2 т., Т. 1., Харків, Вид-во НФаУ, 2016. С. 210.
13. Stability studies of compounding ointment with herbal tinctures / L. P. Savchenko, K. A. Uminska, V. A. Georgiyants, L. Ivanauskas. "Science and practice 2016": the 7<sup>th</sup> International Pharmaceutical Conference, Kaunas, Lithuania, 20-21 October, 2016. Kaunas, 2016. P. 43-44.
14. Савченко Л. П., Умінська К. А., Георгіянец В. А. Розробка методики кількісного визначення ментолу в екстемпоральній мазі. *Управління якістю в фармації*: мат. XI науково-практичної конференції, Харків, 19 травня 2017 р. Харків, Вид-во НФаУ, 2017. С. 153.
15. Савченко Л. П., Уминская Е. А., Георгіянец В. А. Headspace аналіз в дослідженні екстемпоральної мазі з рослинними настоянками. *Медичні науки: напрямки та тенденції розвитку в Україні та світі*: мат. міжнародної науково-практичної конференції, Одеса, 16-17 червня 2017 р. Одеса, ГО "Південна фундація медицини", 2017. С. 20-21.
16. Studying of the compounding ointment with Eucalyptus tincture rheological parameters / L. P. Savchenko, K. A. Uminska, G. P. Kukhtenko, V. A. Georgiyants. *Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice: the 8<sup>th</sup> International Conference*, Kaunas, Lithuania, 15 December, 2017. Kaunas, 2017. P. 28-29.
17. Использование метода газовой хроматографии с масс-детектором для изучения стабильности экстемпоральных мазей / Л. П. Савченко, Е. А. Уминская, В. А. Георгіянец, Л. Иванаускас, Н. Б. Саидов. *Наука и инновация*. 2017. № 3. С. 36-38.

18. Development and validation of the GC method for the chemical stability estimation of the compounding ointment with Eucalyptus tincture / V. Georgiyants, L. Savchenko, K. Uminska, L. Ivanauskas. *ChemCYS 2018: Chemistry Conference for Young Scientists*, Blankenberge, Belgium, 21-23 February 2018. Blankenberge, 2018. P. 63.
19. Умінська К. А., Савченко Л. П., Георгіянц В. А. Дослідження хімічної стабільності мазі Симановського. *Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій: тези доповідей Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича, Харків, 12-13 квітня 2018*. Харків, НФаУ, 2018. С. 351.

Продовж. дод. А

### **Апробація результатів дисертації**

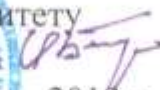
Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. VI науково-практична конференція з міжнародною участю «Управління якістю в фармації» (Харків, 17 квітня 2013 р., форма участі – публікація тез);
2. Міжнародна науково-практична конференція «Аналітична хімія у фармації» (Харків, 19-20 березня 2015 р., форма участі – публікація тез);
3. I науково-практична інтернет-конференція з міжнародною участю «Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку» (Харків, 24-25 березня 2016 р., форма участі – публікація тез);
4. VIII Національний з'їзд фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (Харків, 13-16 вересня 2016 р., форма участі – публікація тез);
5. The 7<sup>th</sup> International Pharmaceutical Conference «Science and practice 2016» (Kaunas, Lithuania, 20-21 October, 2016, форма участі – публікація тез);
6. . XI науково-практична конференція з міжнародною участю «Управління якістю в фармації» (Харків, 19 травня 2017 р., форма участі – публікація тез);
7. .Міжнародна науково-практична конференція «Медичні науки: напрямки та тенденції розвитку в Україні та світі» (Одеса, 16-17 червня 2017 р., форма участі – публікація тез);
8. The 8<sup>th</sup> International Conference «Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice» (Kaunas, Lithuania, 15 December, 2017, форма участі – публікація тез);

9. Міжнародна науково-практична конференція «Наука и инновация» (Таджикистан, грудень 2017 р., форма участі – публікація тез);
10. Chemistry Conference for Young Scientists «ChemCYS 2018» (Blankenberge, Belgium, 21-23 February 2018, форма участі – постерна доповідь) ;
11. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвячена 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича «Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій» (Харків, 12-13 квітня 2018 р., форма участі – публікація тез).



Додаток Б  
**Акти впровадження**

«Затверджую»  
 Проректор з науково-педагогічної роботи  
 Одеського національного медичного університету  
 проф. Ю. І. Бажора   
 2018 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Пропозиція до впровадження:** методика кількісного визначення ментолу методом газової хроматографії з полуменево-іонізаційним детектором в складі екстемпоральної мазі для вивчення її хімічної стабільності.

**2. Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, проф. Георгіянц В. А., доц. Савченко Л. П., здоб. Умінська К. А.

**3. Джерела інформації:**

1. Development and validation of a gas chromatographic method for the menthol assay in compounding ointment / L. P. Savchenko, L. Ivanauskas, K. A. Uminska, Z. Barsteigiene, V. A. Georgiyants. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. Vol. 10 (3). P. 450-453.
2. Савченко Л. П., Умінська К. А., Георгіянц В. А. Розробка методики кількісного визначення ментолу в екстемпоральній мазі. *Управління якістю в фармації*: мат. XI науково-практичної конференції, Харків, 19 травня 2017 р. Харків, Вид-во НФаУ, 2017. С. 153.

Запропонована методика кількісного визначення ментолу в складі мазі Симановського методом газової хроматографії, проведена її валідація.

**4. Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної хімії Одеського національного медичного університету.

**5. Форма впровадження:** науково-педагогічний процес кафедри.

**6. Ефект від впровадження:** наявність валідованої методики кількісного визначення ментолу методом газової хроматографії з полуменево-іонізаційним детектором, яка може бути використана для оцінки хімічної стабільності мазі Симановського за кількісним вмістом ментолу.

**7. Термін впровадження:** 2018-2019 н.р.

Завідувач кафедри фармацевтичної хімії Одеського національного медичного університету,  
 доктор хімічних наук, професор



В.О. ГЕЛЬМБОЛЬДТ

«Затверджую»

Проректор з наукової роботи  
 Національного медичного  
 університету імені О.О. Богомольця  
 проф. Т. М. Черенько



08 2018 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Пропозиція до впровадження:** Методики ідентифікації біологічно активних компонентів мазі з настоянками календули та евкالیпту методами газової хроматографії для вивчення їх стабільності.

**2. Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, проф. Георгіянц В. А., доц. Савченко Л. П., здоб. Умінська К. А.

**3. Джерела інформації:**

1. Савченко Л. П., Умінська К. А., Георгіянц В. А. Використання методу Headspace для експрес-аналізу екстемпоральної мазі з настоянками календули та евкالیпту. *Зб. наук. праць співробіт. НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2017. Вип. 28. С. 115-122.
2. Использование метода газовой хроматографии с масс-детектором для изучения стабильности экстемпоральных мазей / Л. П. Савченко, Е. А. Уминская, В. А. Георгиянц, Л. Иванаускас, Н. Б. Саидов. *Наука и инновация*. 2017. № 3. С. 36-38.

Запропоновані методики ідентифікації біологічно активних компонентів екстемпоральної мазі з настоянками календули та евкالیпту, які можуть використані при оцінці її хімічної стабільності.

**4. Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної, біологічної та токсикологічної хімії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. № 26

**5. Форма впровадження:** науково-педагогічний процес кафедри. Від 26.06.18

**6. Ефект від впровадження:** наявність медик визначення біологічно активних компонентів настоянок календули та евкالیпту в складі мазі аптечного виготовлення методами парофазного аналізу та газової хроматографії з мас-детектором. Обрані маркери для аналізу стабільності мазі.

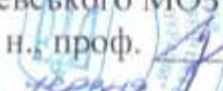
**7. Термін впровадження:** 2018-2019 н.р.

Завідувач кафедри фармацевтичної,  
 біологічної та токсикологічної хімії  
 Національного медичного університету  
 імені О.О. Богомольця  
 доктор мед. наук, професор

І.В. НИЖЕНКОВСЬКА



«Затверджую»

Проректор з наукової роботи  
ДВНЗ «Тернопільський державний  
медичний університет імені І. Я.  
Горбачевського МОЗ України»  
д. біол. н., проф. Кліщ І. М.  
“15”  2018 р

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Пропозиція до впровадження:** Методики кількісного визначення діючих речовин у екстемпоральних мазях з настоянками календули та евкаліпту; з ментолом.

**2. Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, проф. Георгіянец В. А., доц. Савченко Л. П., проф. Іванаускас Л., проф. Барстігене З., асист. Терещенко Л. В., здоб. Умінська К. А.

**3. Джерела інформації:**

а) Development and validation of a gas chromatographic method for the menthol assay in compounding ointment / L. P. Savchenko, L. Ivanauskas, K. A. Uminska, Z. Barsteigiene, V. A. Georgiyants. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. Vol. 10 (3). P. 450-453.

б) Identification of Calendula and Eucalyptus alcoholic tinctures volatile compounds in the compounding ointment by Gas chromatography-mass spectrometry. Lesia P. Savchenko, Liudas Ivanauskas, Kateryna A. Uminska, Lyubov V. Tereshchenko, Victoriya A. Georgiyants. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2018. Vol. 12 (1), Suppl. Issue. P. 145-150.

Запропонована методика кількісного визначення ментолу методом газової хроматографії з полуменево-іонізаційним детектором. Запропонована методика ідентифікації компонентів настоянок календули та евкаліпту методом газової хроматографії з мас-детектором в складі екстемпоральної мазі.

**4. Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної хімії ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України».

**5. Форма впровадження:** науково-педагогічний процес кафедри.

**6. Ефект від впровадження:** удосконалення знань студентів та науковців з питань можливих методів кількісного визначення ментолу, ідентифікації компонентів рослинного походження в екстемпоральних мазях з настоянками із ЛРС.

**7. Термін впровадження:** 2018-2019 н. р.

Завідувач кафедри фармацевтичної хімії  
ДВНЗ «Тернопільський державний медичний  
університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»  
канд. фарм. наук, доцент



О. Б. Поляк



«Затверджую»

Проректор з наукової роботи  
Вінницького національного  
медичного університету ім. М.І. Пирогова

проф. О. В. Власенко

„19” серпня 2018 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Пропозиція до впровадження:** верифіковані методики кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду та цинку оксиду в складі мазі Симановського аптечного виготовлення.

**2. Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, проф. Георгіянт В. А., доц.. Савченко Л. П., доц.. Бевз Н. Ю., здоб. Умінська К. А.

#### 3. Джерела інформації:

1. Selection and verification of the method for phenylephrine hydrochloride assay in Simanovsky ointment / L. Savchenko, K. Uminska, N. Bevz, V. Georgiyants. *Scientific Journal «Science Rise: Pharmaceutical Science»*. 2018. Vol. 1 (11). P. 26-31.

2. Savchenko L. P., Uminska K. A., Georgiyants V. A. Verification of the zinc oxide assay method in Simanovsky ointment for its chemical stability estimation. *International Journal For Research In Biology & Pharmacy*. 2018. Vol. 4, Is. 3. P. 23-31.

Запропоновані методики кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду (методом абсорбційної спектрофотометрії) та цинку оксиду (методом комплексонометрії) в складі мазі Симановського.

**4. Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

**5. Форма впровадження:** науково-педагогічний процес кафедри.

**6. Ефект від впровадження:** наявність верифікованих методик кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду та цинку оксиду, які можуть бути використані в аналізі якості мазі та оцінці її хімічної стабільності.

**7. Термін впровадження:** 2017-2018 н.р.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова  
Протокол №1 від 29.08.2018 р.

Відповідальний за впровадження,  
завідувач кафедри фармацевтичної хімії  
Вінницького національного  
медичного університету ім. М.І. Пирогова,  
к. хім. н., доцент

Т. І. Ющенко



«Затверджую»



Проректор з наукової роботи  
Львівського національного медичного  
університету ім. Данила Галицького  
проф. А. Й. Наконечний

“ 07 ” 06 2018 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Пропозиція до впровадження:** верифіковані методики кількісного визначення діючих речовин (фенілефрину гідрохлориду та цинку оксиду) у складі мазі Симановського.
- 2. Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, проф. Георгіянц В.А., доц. Савченко Л.П., доц. Бевз Н.Ю., здоб. Умінська К.А.
- 3. Джерела інформації:**
  1. Selection and verification of the method for phenylephrine hydrochloride assay in Simanovsky ointment / L. Savchenko, K. Uminska, N. Bevz, V. Georgiyants. *Scientific Journal «Science Rise: Pharmaceutical Science»*. 2018. Vol. 1 (11). P. 26-31.
  2. Savchenko L.P., Uminska K.A., Georgiyants V A. Verification of the zinc oxide assay method in Simanovsky ointment for its chemical stability estimation. *International Journal For Research In Biology & Pharmacy*. 2018. Vol. 4, Is. 3. P. 23-31.

Верифіковані методики кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду та цинку оксиду в складі мазі Симановського аптечного виготовлення.
- 4. Де впроваджено:** кафедра фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького..
- 5. Форма впровадження:** науково-педагогічний процес кафедри.
- 6. Ефект від впровадження:** удосконалення знань студентів та науковців з питань можливих методів кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду та цинку оксиду в складі мазі Симановського.
- 7. Термін впровадження:** 2018-2019 н.р.

Завідувач кафедри фармацевтичної,  
органічної і біоорганічної хімії  
Львівського національного медичного  
університету ім. Данила Галицького,  
докт. фарм. наук, професор

Р.Б. Лесик



«Затверджую»

Проректор з наукової роботи  
Запорізького державного медичного  
університету

проф. В. О. Туманський

" 21 " 28 2018 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

- |                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| <b>1. Пропозиція до впровадження:</b> | методика парофазного аналізу екстемпоральної мазі з настоянками календули та евкаліпту.  |
| <b>2. Установа, автор:</b>            | Національний фармацевтичний університет, кафедра фармацевтичної хімії, м. Харків, проф. Георгіянц В. А., доц. Савченко Л. П., здоб. Умінська К. А.   |
| <b>3. Джерела інформації:</b>         | Савченко Л. П., Умінська К. А., Георгіянц В. А. Використання методу Headspace для експрес-аналізу екстемпоральної мазі з настоянками календули та евкаліпту. <i>Зб. наук. праць співробіт. НМАПО ім. П. Л. Шупика</i> . 2017. Вип. 28. С. 115-122.<br>Методика ідентифікації компонентів рослинного походження в екстемпоральній мазі методом парофазного аналізу. |
| <b>4. Де впроваджено:</b>             | кафедра фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету.   |
| <b>5. Форма впровадження:</b>         | науково-педагогічний процес кафедри.   |
| <b>6. Результат впровадження:</b>     | удосконалення знань студентів та науковців з питань можливості ідентифікації компонентів рослинного походження в складі екстемпоральних мазей методами парофазного аналізу.  |
| <b>7. Термін впровадження:</b>        | 01.2018-06.2018 н.р.   |

Завідувач кафедри фармацевтичної  
хімії Запорізького державного  
медичного університету,  
доктор фармацевтичних наук, професор

 Л. І. Кучеренко





**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**

Начальник Державної служби з  
лікарських засобів та контролю за  
наркотиками у Сумській області



Л. А. Ситнік

2017 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** контроль якості лікарських засобів.
2. **Установа, автори:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, проф. Георгіянц В. А., проф. Стрілець О.П., доц. Савченко Л.П., здоб. Умінська К.А.
3. **Джерело інформації:** Умінська К. А., Стрілець О. П., Савченко Л. П., Георгіянц В. А. Оцінка мікробіологічної стабільності екстемпоральної мазі для назального застосування. Зб. наук. праць співробіт. НМАПО ім. П. Л. Шупика. 2015. Вип. 24, кн. 5. С. 366–370.
4. **Де впроваджено:** Державна служба з лікарських засобів та контролю за наркотиками у Сумській області.
5. **Форма впровадження:** практична діяльність.
6. **Ефект від впровадження:** оцінка мікробіологічної чистоти мазі. Ефективність впровадження даної розробки полягає у можливості збільшення терміну придатності мазі на основі отриманих результатів аналізу.
7. **Термін впровадження:** 2017-2018 рр.

Відповідальний за впровадження:  
заступник начальника служби – завідувача  
сектором державного контролю у сфері  
обігу лікарських засобів, медичної продукції  
та обігу наркотичних засобів, психотропних  
речовин та прекурсорів

С. М. Говтва

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Начальник Державної служби з  
лікарських засобів та контролю за  
наркотиками у Житомирській області

 С. А. Моторний

«29» травня 2018 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** контроль якості лікарських засобів.
2. **Установа, автори:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, доц. Савченко Л.П., здоб. Умінська К.А., проф. Георгіянц В.А., доц. Бевз Н.Ю., проф. Іванаускас Л., проф. Барстігене З.
3. **Джерела інформації:**
  - а) Development and validation of a gas chromatographic method for the menthol assay in compounding ointment / L. P. Savchenko, L. Ivanauskas, K. A. Uminska, Z. Barsteigiene, V. A. Georgiyants. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. Vol. 10 (3). P. 450-453.
  - б) Selection and verification of the method for phenylephrine hydrochloride assay in Simanovsky ointment / L. Savchenko, K. Uminska, N. Bevz, V. Georgiyants. *Scientific Journal «Science Rise: Pharmaceutical Science»*. 2018. Vol. 1 (11). P. 26-31.
  - в) Savchenko L. P., Uminska K. A., Georgiyants V. A. Verification of the zinc oxide assay method in Simanovsky ointment for its chemical stability estimation. *International Journal For Research In Biology & Pharmacy*. 2018. Vol. 4, Is. 3. P. 23-31.
4. **Де впроваджено:** Державна служба з лікарських засобів та контролю за наркотиками у Житомирській області.
5. **Форма впровадження:** практична діяльність.
6. **Ефект від впровадження:** методики кількісного аналізу компонентів мазі Симановського аптечного виготовлення. Ефективність впровадження даної розробки полягає у наявності валідованих та верифікованих методик кількісного визначення ментолу, фенілефрину гідрохлориду та цинку оксиду, що дозволить оцінювати якість мазі на сучасному рівні.
7. **Термін впровадження:** 2018-2019 рр.

Відповідальний за впровадження:  
завідувач лабораторії з контролю  
якості лікарських засобів та контролю  
за наркотиками Державної служби  
з лікарських засобів та контролю за наркотиками  
у Житомирській області

 Л.С. Откидач

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**

Начальник Державної служби з  
лікарських засобів та контролю за  
наркотиками у Житомирській області


 С. А. Моторний

«29» травня 2018 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

- 1. Найменування пропозиції для впровадження:** контроль якості лікарських засобів.
- 2. Установа, автори:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, доц. Савченко Л.П., здоб. Умінська К.А., проф. Георгіянц В.А.
- 3. Джерело інформації:** Савченко Л. П., Умінська К. А., Георгіянц В. А. Використання методу Headspace для експрес-аналізу екстемпоральної мазі з настоянками календули та евкалипту. *Зб. наук. праць співробіт. НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2017. Вип. 28. С. 115-122.
- 4. Де впроваджено:** Державна служба з лікарських засобів та контролю за наркотиками у Житомирській області.
- 5. Форма впровадження:** практична діяльність.
- 6. Ефект від впровадження:** методика експрес-аналізу мазі з настоянками календули та евкалипту. Ефективність впровадження даної розробки полягає у можливості проведення швидкого аналізу якості та стабільності мазі за результатами визначення вмісту біологічно активних компонентів настоянок протягом всього терміну зберігання.
- 7. Термін впровадження:** 2018-2019 рр.

Відповідальний за впровадження:  
завідувач лабораторії з контролю  
якості лікарських засобів та контролю  
за наркотиками Державної служби  
з лікарських засобів та контролю за наркотиками  
у Житомирській області

 Л.С. Откидач



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор ТзОВ «Адоніс В»

Зав. аптекою №130

 *С. І. Бисага* С. І. Бисага

«*11*» *листопада* 2017 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** контроль якості лікарських засобів.
2. **Установа, автори:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, проф. Георгіянц В. А., проф. Стрілець О.П., доц. Савченко Л.П., здоб. Умінська К.А.
3. **Джерело інформації:** Умінська К. А., Стрілець О. П., Савченко Л. П., Георгіянц В. А. Оцінка мікробіологічної стабільності екстемпоральної мазі для назального застосування. Зб. наук. праць співробіт. НМАПО ім. П. Л. Шупика. 2015. Вип. 24, кн. 5. С. 366–370.
4. **Де впроваджено:** Аптека №130.
5. **Форма впровадження:** практична діяльність.
6. **Ефект від впровадження:** оцінка мікробіологічної чистоти мазі. Ефективність впровадження даної розробки полягає у можливості збільшення терміну придатності мазі на основі отриманих результатів аналізу.
7. **Термін впровадження:** 2017-2018 рр.

Відповідальний за впровадження:  
провізор

С. І. Шпеник

*С. І. Шпеник*

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**  
 Завідувач ПП аптека «Дитяча»  
 м. Житомир

А. О. Андрійчук

\_\_\_\_\_ 2018 р.

*ТРАВЕНЬ*



### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Найменування пропозиції для впровадження:** контроль якості лікарських засобів.
- 2. Установа, автори:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, доц. Савченко Л.П., здоб. Умінська К.А., проф. Георгіянц В.А., доц. Бевз Н.Ю., проф. Іванаускас Л., проф. Барстігене З.
- 3. Джерела інформації:**
  - а) Development and validation of a gas chromatographic method for the menthol assay in compounding ointment / L. P. Savchenko, L. Ivanauskas, K. A. Uminska, Z. Barsteigiene, V. A. Georgiyants. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. Vol. 10 (3). P. 450-453.
  - б) Selection and verification of the method for phenylephrine hydrochloride assay in Simanovsky ointment / L. Savchenko, K. Uminska, N. Bevz, V. Georgiyants. *Scientific Journal «Science Rise: Pharmaceutical Science»*. 2018. Vol. 1 (11). P. 26-31.
  - в) Savchenko L. P., Uminska K. A., Georgiyants V. A. Verification of the zinc oxide assay method in Simanovsky ointment for its chemical stability estimation. *International Journal For Research In Biology & Pharmacy*. 2018. Vol. 4, Is. 3. P. 23-31.
- 4. Де впроваджено:** ПП аптека «Дитяча» м.Житомира.
- 5. Форма впровадження:** практична діяльність.
- 6. Ефект від впровадження:** методики кількісного аналізу компонентів мазі Симановського аптечного виготовлення. Ефективність впровадження даної розробки полягає у наявності валідованих та верифікованих методик кількісного визначення ментолу, фенілефрину гідрохлориду та цинку оксиду, що дозволить оцінювати якість мазі на сучасному рівні.
- 7. Термін впровадження:** 2018-2019 рр.

Відповідальний за впровадження:  
 провізор-аналітик ПП аптеки  
 «Дитяча» м.Житомира



З.Н. Сладковська





«Затверджую»

Директор ТОВ «Аптека № 9»

Носкова Л. А.  
з обмеженою  
відповідальністю  
2018 р.

«03»



### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Пропозиція до впровадження:** Методики ідентифікації та кількісного визначення діючих речовин мазі Симановського аптечного виготовлення. Результати вивчення її мікробіологічної чистоти та хімічної стабільності.

**2. Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, проф. Георгіянц В. А., проф. Стрілець О. П., доц. Савченко Л. П., здоб. Умінська К. А.

**3. Джерела інформації:**

1. Савченко Л. П., Умінська К. А., Георгіянц В. А. Контроль якості мазі Симановського аптечного виготовлення. К., 2018. Вип. 6. 6 с. (Рішення ЕПК «Фармація» Протокол № 103 від 25.10.2017 р.)
2. Оцінка мікробіологічної стабільності екстемпоральної мазі для назального застосування / К. А. Умінська, О. П. Стрілець, Л. П. Савченко, В. А. Георгіянц. *Зб. наук. праць співробіт. НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2015. Вип. 24, кн. 5. С. 366-370.
3. Умінська К. А., Савченко Л. П., Георгіянц В. А. Дослідження хімічної стабільності мазі Симановського. *Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій: тези доповідей Всеукр. наук.-практ. конф. з між нар. участю, присвяченої 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О. М. Гайдукевича, Харків, 12-13 квітня 2018. Харків, НФаУ, 2018. С. 351.*

Запропоновані методики ідентифікації та кількісного визначення компонентів мазі Симановського. Проведена оцінка мікробіологічної чистоти мазі та її хімічної стабільності.

**4. Де впроваджено:** ТОВ «Аптека № 9».

**5. Форма впровадження:** практична діяльність.

**6. Ефект від впровадження:** наявність валідованих або верифікованих методик ідентифікації та кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду, цинку оксиду і ментолу, які можуть бути використані для контролю якості мазі. Результати оцінки мікробіологічної чистоти та хімічної стабільності дозволяють збільшити термін придатності мазі до 30 днів.

**7. Термін впровадження:** 2018-2019 н.р.

Замісник директора  
ТОВ «Аптека № 9»


О.С. Смірнова

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Завідувач аптеки №329

Хмельницької обласної фірми

«Фармація».

 Г. В. Якубовська

«30»  2018 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** контроль якості лікарських засобів.
2. **Установа, автори:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, доц. Савченко Л.П., здоб. Умінська К.А., проф. Георгіянц В.А.
3. **Джерело інформації:** Савченко Л. П., Умінська К. А., Георгіянц В. А. Використання методу Headspace для експрес-аналізу екстемпоральної мазі з настоянками календули та евкаліпту. *Зб. наук. праць співробіт. НМАПО ім. П. Л. Шупика*. 2017. Вип. 28. С. 115-122.
4. **Де впроваджено:** аптека №329 Хмельницької обласної фірми «Фармація».
5. **Форма впровадження:** практична діяльність.
6. **Ефект від впровадження:** методика експрес-аналізу мазі з настоянками календули та евкаліпту. Ефективність впровадження даної розробки полягає у можливості проведення швидкого аналізу якості та стабільності мазі за результатами визначення вмісту біологічно активних компонентів настоек протягом всього терміну зберігання.
7. **Термін впровадження:** 2018-2019 рр.

Відповідальний за впровадження:  
Провізор аптеки №329 Хмельницької  
обласної фірми «Фармація»

 Л.К. Коляновська



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Завідувач аптеки №329

Хмельницької обласної фірми

«Фармація».

Г. В. Якубовська

«30» травня 2018 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** контроль якості лікарських засобів.
2. **Установа, автори:** Національний фармацевтичний університет (м. Харків), 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53, доц. Савченко Л.П., здоб. Умінська К.А., проф. Георгіянц В.А., доц. Бевз Н.Ю., проф. Іванаускас Л., проф. Барстігене З.
3. **Джерела інформації:**
  - а) Development and validation of a gas chromatographic method for the menthol assay in compounding ointment / L. P. Savchenko, L. Ivanauskas, K. A. Uminska, Z. Barsteigiene, V. A. Georgiyants. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. Vol. 10 (3). P. 450-453.
  - б) Selection and verification of the method for phenylephrine hydrochloride assay in Simanovsky ointment / L. Savchenko, K. Uminska, N. Bevz, V. Georgiyants. *Scientific Journal «Science Rise: Pharmaceutical Science»*. 2018. Vol. 1 (11). P. 26-31.
  - в) Savchenko L. P., Uminska K. A., Georgiyants V. A. Verification of the zinc oxide assay method in Simanovsky ointment for its chemical stability estimation. *International Journal For Research In Biology & Pharmacy*. 2018. Vol. 4, Is. 3. P. 23-31.
4. **Де впроваджено:** аптека №329 Хмельницької обласної фірми «Фармація».
5. **Форма впровадження:** практична діяльність.
6. **Ефект від впровадження:** методики кількісного аналізу компонентів мазі Симановського аптечного виготовлення. Ефективність впровадження даної розробки полягає у наявності валідованих та верифікованих методик кількісного визначення ментолу, фенілефрину гідрохлориду та цинку оксиду, що дозволить оцінювати якість мазі на сучасному рівні.
7. **Термін впровадження:** 2018-2019 рр.

Відповідальний за впровадження:

Провізор аптеки №329 Хмельницької  
обласної фірми «Фармація»

*Л.К. Коляновська*

Л.К. Коляновська